

CARLOS EDUARDO DELAY

**“Estudo da Comunicação Química, Acústica-Vibracional e da Eficiência de
Pesticidas e de Repelentes Visando o Controle Populacional da Aranha-
Marrom *Loxosceles intermedia*”**

Tese apresentada como requisito parcial à Obtenção
do grau de Doutor em Química, Curso de Pós Graduação
em Química-Área de Concentração em Química
Orgânica, Setor de Ciências Exatas, UFPR.

Orientador: Prof. Dr. Francisco de Assis Marques
Co-Orientador: Prof. Dr. Eduardo Novaes Ramires

CURITIBA

2007

**Dedico este trabalho
a minha Família que sempre
me apoiou, para hoje ser o que sou.**

AGRADECIMENTOS

- A DEUS pelo constante amparo.
- Aos meus pais Orlando e Neuza e aos meus irmãos Jr e Rodrigo pelo incentivo e força nas horas difíceis.
- Ao professor Francisco de Assis Marques por seu aceite, sua orientação, confiança, amizade e estímulo no desenvolvimento do trabalho. Hoje percebo que acertei em certos pontos e que também cometi muitas falhas. No entanto, saio fortalecido para enfrentar os desafios futuros, tentando não mais repetir os erros do passado. Talvez este seja um dos maiores aprendizados da Pós Graduação, muito necessário para continuarmos num mundo científico com cada vez mais perguntas a se fazer e cada vez menos prazo para se responder. A você o meu especial obrigado!
- Ao professor Eduardo Ramires (UTP), Co-Orientador deste projeto, pela orientação, amizade e pelas aventuras em dias de coleta. Devo agradecer aqui o seu precioso tempo e esforço que trouxeram-me incalculável crescimento. Muito aprendi com você e a você meu especial obrigado!
- Ao Prof. Dr. José Domingos Fontana - Coordenador do Projeto PRONEX
- Ao Doutorando Jonny Duque, e ao Prof. Mario Navarro (Departamento de Zoologia) colaboradores do projeto nos ensaios com os pesticidas.

- À Prof^a. Marta Luciane Fischer – PUC-Pr e ao pesquisador Emanuel Marques-da-Silva (SESA-PR) pelo apoio nos testes comportamentais.
- Ao Dr. Stefan Schulz - Technical University of Braunschweig – Alemanha, pela colaboração na identificação dos compostos cuticulares.
- Ao Dr. Andrej Cokl, Instituto Nacional de Biologia – Eslovênia, pela colaboração nos ensaios acústicos e vibracionais emitidos na comunicação da espécie *L. intermedia*.
- Aos professores do Departamento, em especial a professora Maria Aparecida Ferreira César Oliveira, pela amizade e por ser uma das maiores responsáveis por minha formação acadêmica e intelectual.
- Ao Ângelo pela grande amizade.
- Às professoras Ana Luisa e Maria Aparecida e ao professor Brás Heleno pelas importantes observações e correções durante o Exame de Qualificação.
- Às professoras Maria de Fátima das Graças Fernandes da Silva (UFSCar), a professora Anita Jocelyne Marsaioli (UNICAMP), a professora Ana Luísa Lacava Lordello (UFPR) e ao professor Brás Heleno de Oliveira (UFPR), pelo aceite em participarem da banca examinadora e pelas importantes considerações realizadas.
- Aos meus grandes amigos Pedro e Sandra Zanin.

- Aos grandes e inesquecíveis amigos do LEQSO; Alcindo, Giuliano, Celso, César, Davi, Alberto, Jefferson, Rogério e José Augusto.
- Aos amigos de laboratório; Celso Wosch, Gustavo e Bianca.
- Aos demais professores do Departamento de Química.
- Aos inúmeros funcionários, os quais sempre ajudaram na solução dos meus “imprevistos” em especial ao Diel, Marcelino, Sônia, Juny, Neusa, Selma, Alice, Ivono e Paulo (hialotécnico), a vocês meu muito obrigado.
- Aos “eternos amigos e colegas” do Departamento.
- A todos que de alguma forma, contribuíram para minha formação.
- Ao Sr. Rubens Gusso, diretor do Centro de Produção e Pesquisas de Imunobiológicos (CPPI) e à Secretaria de Estado da Saúde do Paraná, parceiros deste projeto.
- À Fundação Araucária e ao MCT/CNPq pelo apoio ao projeto PRONEX.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	i
SUMÁRIO	v
LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE TABELAS	xiv
LISTA DE GRÁFICOS	xvi
LISTA DE ESQUEMAS	xvii
LISTA DE SIGLAS, SÍMBOLOS E ABREVIATURAS	xviii
RESUMO	xx
ABSTRACT	xxvii
I- INTRODUÇÃO	1
I.1- ASPECTOS GERAIS SOBRE ARANHAS	1
I.2- CARACTERÍSTICAS GERAIS SOBRE O GÊNERO <i>Loxosceles</i>	3
I.3- DADOS BIOLÓGICOS E ECOLÓGICOS RELACIONADOS AO GÊNERO <i>Loxosceles</i>	5
I.3.1- REPRODUÇÃO	5
I.3.2- TEIAS PRODUZIDAS PELA ESPÉCIE <i>L. intermedia</i>	6
I.3.3- CONSTITUIÇÃO QUÍMICA DAS TEIAS	8
I.3.3.1- CONFORMAÇÃO ESTRUTURAL DAS TEIAS	9
I.4- TAXONOMIA DO GÊNERO <i>Loxosceles</i>	9
I.5- FILOGENIA DAS ESPÉCIES DE <i>Loxosceles</i> PRESENTES NO BRASIL	11
I.6- <i>Loxosceles</i> E O AMBIENTE CÁRSTICO	11
I.7- ESPÉCIES DE <i>Loxosceles</i> PRESENTES NA REGIÃO SUL DO BRASIL	12
I.8- <i>Loxosceles intermedia</i>	13
I.9 - LOXOSCELISMO	15
I.9.1- LOXOSCELISMO NO ESTADO DO PARANÁ	17
I.10- FORMA E CONSEQUÊNCIA DOS ATAQUES ENVOLVENDO ARANHAS DO GÊNERO <i>Loxosceles</i>	18

I.11- NÍVEIS E CARACTERÍSTICAS DAS PICADAS DE ARANHAS DO GÊNERO <i>Loxosceles</i>	19
I.12- QUADRO DERMONECRÓTICO OU CUTÂNEO	21
I.13- QUADRO CUTÂNEO-VISCERAL OU SISTÊMICO	24
I.14- CARACTERÍSTICAS BIOQUÍMICAS DOS VENENOS DE <i>L. intermedia</i>	24
I.15- AÇÃO DO VENENO DO GÊNERO <i>Loxosceles</i> NOS VASOS SANGÜÍNEOS	26
I.16- TRATAMENTO POR PICADA DE ARANHA-MARROM	28
I.17- CONTROLE POPULACIONAL DE <i>L. intermedia</i>	29
I.18- PREDADORES NATURAIS	30
I.19- INFOQUÍMICOS	32
I.20- MÉTODOS DE ANÁLISE DE INFOQUÍMICOS EM ARANHAS	33
I.21- ALELOQUÍMICOS EM ARANHAS	35
I.21.1- ALOMÔNIOS	35
I.21.2- CAIROMÔNIOS	38
I.22- FEROMÔNIOS EM ARANHAS	40
I.22.1- FEROMÔNIOS DE ARANHAS IDENTIFICADOS	50
I.22.1.1- Linyphiidae	50
I.22.1.2- Agelenidae	52
I.22.1.3- Ctenidae	53
I.23- COMPOSIÇÃO QUÍMICA E PAPEL DOS LIPÍDEOS NA COMUNICAÇÃO DE ARANHAS	54
II- OBJETIVOS	57
II.1- OBJETIVOS ESPECÍFICOS	57
III- PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	58
III.1- ASPECTOS GERAIS	58
III.2- AVALIAÇÃO DA EXISTÊNCIA DE INFOQUÍMICOS EM <i>Loxosceles intermedia</i>	61
III.2.1- INFOQUÍMICOS MEDIANDO COMUNICAÇÃO INTRAESPECÍFICA	61
III.2.2- AERAÇÃO DE MACHOS E FÊMEAS DE <i>Loxosceles intermedia</i>	64

III.2.3- LAVAGEM DO CORPO DE MACHOS E FÊMEAS ADULTAS COM DICLOROMETANO	65
III.2.3.1- TESTE COMPORTAMENTAL COM EXTRATOS OBTIDOS ATRAVÉS DA LAVAGEM DOS CORPOS DAS ARANHAS	66
III.2.3.2- TESTE COMPORTAMENTAL COM ACETATO DE GERANILA (14) E GERANIL ACETONA (15)	67
III.3- COMUNICAÇÃO ACÚSTICA-VIBRACIONAL EM <i>Loxosceles intermedia</i>	68
III.3.1- GRAVAÇÃO DOS SINAIS TRANSMITIDOS PELAS ARANHAS	68
III.3.2- INFLUÊNCIA DA RETIRADA DOS PEDIPALPOS NO CORTEJO E CÓPULA	69
III.4- AVALIAÇÃO PRELIMINAR COMPORTAMENTAL E DE TOXICIDADE DE COMPOSTOS SELECIONADOS AO CONTROLE DA ARANHA-MARROM	70
III.4.1- AVALIAÇÃO PRELIMINAR DE TOXICIDADE DOS COMPOSTOS	70
III.4.2- TESTE DE REPELÊNCIA-EFEITO DESALOJANTE SOBRE A ARANHA-MARROM	71
III.5- AVALIAÇÃO DA SUSCEPTIBILIDADE DE <i>Loxosceles intermedia</i> A PESTICIDAS PIRETRÓIDES	73
III.6- PROCEDIMENTOS ESTATÍSTICOS	75
IV - RESULTADOS E DISCUSSÕES	76
IV.1- AVALIAÇÃO EXPERIMENTAL DA EXISTÊNCIA DE INFOQUÍMICOS EM <i>Loxosceles intermedia</i>	76
IV.1.1- INFOQUÍMICOS MEDIANDO COMUNICAÇÃO INTRAESPECÍFICA	76
IV.1.2- AERAÇÃO DE MACHOS E FÊMEAS	79
IV.1.3- LAVAGEM DO CORPO DE MACHOS E FÊMEAS ADULTOS COM DICLOROMETANO	84
IV.1.3.1- TESTES COM OS EXTRATOS OBTIDOS ATRAVÉS DA LAVAGEM DOS CORPOS DAS ARANHAS	93
IV.1.3.2- TESTE COMPORTAMENAL COM ACETATO DE GERANILA E GERANIL ACETONA	97

IV.2- AVALIAÇÃO DA COMUNICAÇÃO ACÚSTICA-VIBRACIONAL EM <i>L. intermedia</i>	99
IV.2.1- COMUNICAÇÃO ACÚSTICA-VIBRACIONAL EM ARANHAS DO GÊNERO <i>LOXOSCELES</i>	100
IV.2.2- ETAPAS DO CORTEJO DE <i>L. intermedia</i>	103
IV.2.3- CARACTERÍSTICAS DOS SINAIS ACÚSTICOS-VIBRACIONAIS ENVOLVIDOS NO PROCESSO DE CÓPULA DA ESPÉCIE <i>L. intermedia</i>	104
IV.3- AVALIAÇÃO PRELIMINAR COMPORTAMENTAL E DE TOXICIDADE DE COMPOSTOS SELECIONADOS PARA O CONTROLE DA ARANHA-MARROM	112
IV.3.1- AVALIAÇÃO PRELIMINAR DE TOXICIDADE DOS COMPOSTOS	112
IV.3.2- TESTE DE REPELÊNCIA/EFEITO DESALOJANTE SOBRE A ARANHA-MARROM	115
IV.4- AVALIAÇÃO DA SUSCEPTIBILIDADE DE <i>Loxosceles intermedia</i> A PESTICIDAS PIRETRÓIDES	119
IV.4.1- PIRETRÓIDES COMO INSETICIDAS	119
IV.4.2- PIRETRINAS NATURAIS	121
IV.4.3- PIRETRÓIDES SINTÉTICOS	123
IV.4.3.1- PIRETRÓIDES SINTÉTICOS FOTOLÁBEIS	125
IV.4.3.2- PIRETRÓIDES SINTÉTICOS FOTOESTÁVEIS	127
IV.4.4- RELAÇÃO ESTRUTURA-ATIVIDADE EM PIRETRÓIDES	128
IV.4.5- PESTICIDAS NO CONTROLE DE ARANHAS	130
IV.4.6- RESULTADOS EXPERIMENTAIS DA UTILIZAÇÃO DE PESTICIDAS PIRETRÓIDES NO COMBATE A <i>Loxosceles intermedia</i>	134
V- CONCLUSÕES	139
VI- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	143

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Ampliação do cefalotórax de uma *Loxosceles*, com ênfase nos três pares de olhos.

Figura 2- Aranhas do gênero *Loxosceles*. Figura (a) macho da espécie *L. gaucho* e Figura (b) macho da espécie *L. laeta*.

Figura 3- Foto (a), teia de uma fêmea de *L. intermedia* em estado natural. As micrografias (b) e (c) foram obtidas a partir de microscopia eletrônica de varredura em uma escala de 10 μm .

Figura 4- Estrutura secundária do tipo β -conformação.

Figura 5- Principais aminoácidos que constituem a composição química da teia das aranhas.

Figura 6- Aranhas do gênero *Loxosceles*, espécie *intermedia*. Figura (a) fêmea e (b) macho.

Figura 7- Lesão dermonecrótica em coelho provocada pelo veneno de *L. intermedia*.

Figura 8- Lesão cutânea necrótica, com formação de ferida de difícil cicatrização e que pode originar seqüelas deformantes.

Figura 9- Foto da lagartixa (*Hemidactylus mabouia*), potencial predador natural da aranha-marrom.

Figura 10- Foto da aranha *Scytodes globula*.

Figura 11- Compostos identificados como sendo componentes do feromônio sexual do lepidóptero *Tetanolita mynesalis*, também produzidos por duas espécies de aranhas predadoras *M. cornigera* e *M. hutchinsoni*.

Figura 12- Compostos constituintes do feromônio sexual de *L. renigera*.

Figura 13- Cairomônio usado pela aranha *Habronestes bradleyi* (Zoodariidae).

Figura 14- Ácido (*R*)-3-hidroxibutírico (**7**), e o ácido (3*R*,3*R'*)-3-butírico(3-hidroxibutirilóxi) (**8**), feromônios liberados na teia de *L. triangularis*.

Figura 15- Compostos detectados em quantidades traços nas teias de *L. triangularis*.

Figura 16- Cetonas identificadas através da lavagem de fêmeas de *A. aperta*.

Figura 17- Feromônio de *C. salei*, (*S*)-1,1'-citrato de dimetila ou ácido (*S*)-3,4-di(metoxicarbonil)-3-hidroxibutanóico).

Figura 18- Olfatômetro discriminante

Figura 19- Gaiola onde foram colocadas as aranhas utilizadas como estímulo.

Figura 20- Iluminação “penumbra” utilizada durante experimentos com olfatômetro.

Figura 21- A figura (a) representa uma visão geral do sistema de aeração; (b) representa em detalhes o confinamento de uma fêmea de *L. intermedia*.

Figura 22- Cromatogramas de extratos de fêmeas e machos aerados.

Figura 23- Espectro de massas do acetato de geranila (**14**) e cromatogramas do padrão de acetato de geranila, extratos e padrões de *n*-alcanos.

Figura 24- Propostas de fragmentação do composto (**14**).

Figura 25- Espectro de massas da geranil acetona (**15**) e cromatogramas do padrão de geranil acetona, extratos e padrões de *n*-alcanos.

Figura 26- Propostas de fragmentações do composto **(15)**.

Figura 27- Perfil cromatográfico obtido após a lavagem de machos **(a)** e de fêmeas **(b)** de *L. intermedia* com diclorometano.

Figura 28- As fragmentações A e B são características em nitrilas substituídas por metilas.

Figura 29- Espectros de massas (IE, 70 eV) de: **(a)** Cianeto de 6-metildotriacontila (sintético); **(b)** Cianeto de 2, 28- dimetiltriacontila (*N. Clavipes*); **(c)** Cianeto de 16, 20, 24, 28- tetrametilentriacontila (*N. Clavipes*); **(d)** Cianeto de 17, 21, 25- trimetilexacosila (sintético).

Figura 30- Fragmentações observadas em *n*-alcanos de cadeia longa ramificados por metilas.

Figura 31- Bioensaios com extratos obtidos pela lavagem dos corpos das aranhas. Macho de *L. intermedia* em contato com papel filtro contendo extrato.

Figura 32- Teste de correspondência efetuado com os resultados comportamentais dos extratos corpóreos.

Figura 33- Vibrômetro a laser utilizado para registrar os sinais estridulatórios e vibratórios.

Figura 34- Microfone de alta sensibilidade.

Figura 35- Padrões motores exibidos pela *L. intermedia* durante o cortejo: **(a)** Toque das pernas dianteiras; **(b)** Vibração dos pedipalpos dos machos; **(c)** Vibração dos pedipalpos das fêmeas e pulsação abdominal; **(d)** Vibrações simultâneas do pedipalpo e pulsações abdominais das fêmeas.

Figura 36- Apresenta o registro de oscilogramas (lado esquerdo) e espectros de frequência (lado direito).

Figura 37- Micrografias **(a - c)** mostram a presença de sulcos estridulatórios no macho; as micrografias **(d - f)** mostram a presença de sulcos estridulatórios nas quelíceras das fêmeas de *L. intermedia*; e as micrografias **(g, h e i)** mostram o pino estridulatório localizado no pedipalpo de uma *L. intermedia* jovem.

Figura 38- Principais constituintes dos produtos utilizados nos experimentos de repelência.

Figura 39- Imagens dos experimentos: (a) *L. intermedia* no pote para experimento de avaliação preliminar comportamental e de toxicidade dos compostos; (b) Arena para teste de repelência/efeito desalojante dos compostos selecionados; (c) Aranha no interior de caixa de fósforos utilizada no teste de repelência/efeito desalojante; (d) Esquema mostrando montagem das caixas de fósforo utilizadas no teste de repelência/efeito desalojante dos compostos selecionados.

Figura 40- Ácidos e álcoois utilizados na síntese de compostos crisantêmicos.

Figura 41 - Estruturas dos constituintes do extrato de piretro.

Figura 42 - Estruturas do ácido tânico **(44)** e da hidroquinona **(45)**, anti-oxidantes naturais presentes nos extratos de *Chrysanthemum cinerariaefolium*.

Figura 43- Estrutura da azadiractina, um potente inseticida natural.

Figura 44- Isômero mais ativo da aletrina, primeiro piretróide sintético comercialmente importante.

Figura 45- Bioresmetrina, isômero mais ativo da resmetrina.

Figura 46- Isômero mais ativo da fenotrina.

Figura 47- Estereoisômero mais estável da permetrina.

Figura 48- Estrutura da deltrametrina (3-(2,2-dibromovinil)-2,2-dimetil-ciclopropano carboxilato de α -ciano-3-fenoxibenzila).

Figura 49- Configurações dos centros quirais em moléculas de piretróides ativos.

Figura 50- Princípios ativos: **(a)** DDT; **(b)** Chlordane; **(c)** Lindane.

Figura 51 - Estrutura química dos princípios ativos dos piritróides utilizados nos experimentos. Compostos **(a)** e **(b)**, mistura dos estereoisômeros da lambda-cialotrina, princípios ativos do Icon 5 CS e do Demand 2,5 CS; Composto **(c)**, deltametrina, princípio ativo do K-Othrine CE 25; e composto **(d)**, cipermetrina, princípio ativo do Cymperator 25 CE.

Figura 52- A figura **(a)** apresenta o experimento em sua fase inicial; figura **(b)** apresenta a aranha morta após contato com o pesticida impregnado no substrato.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Distribuição do loxoscelismo, por macro Região. Brasil, 2001 a 2005.

Tabela 2- Representação esquemática dos semioquímicos e suas subclasses

Tabela 3- Estudos relacionados às publicações de feromônios de aranhas.

Tabela 4- Ocorrência de alcanos e de éteres metílicos nos lipídeos da teia e cutícula de aranhas Linyphiidae.

Tabela 5- Resultados dos experimentos em olfatômetro discriminante (**FCT**: fêmea com teia; **FST**: fêmea sem teia; **C**: controle; **T**: teia; **M**: macho)

Tabela 6- Resultados obtidos para o cálculo do índice de Kovats do acetato de geranila (**14**).

Tabela 7- Resultados obtidos para o cálculo do índice de Kovats da geranil acetona (**15**).

Tabela 8- Compostos identificados em extratos obtidos pela lavagem de machos e fêmeas de *L. intermedia* com diclorometano.

Tabela 9- Valores médios de tempo (\pm SD, n/N) (duração e tempo dos pulsos para as repetições), frequência dominante, velocidade e nível da pressão sonora (SPL), características do substrato de transporte (S) e dos sinais tremulatórios e estridulatórios emitidos e transportados por via aérea por machos e fêmeas de *L. intermedia*.

Tabela 10- Frequência relativa do cortejo nas experiências com machos (**M**) e fêmeas (**F**) com pedipalpos (**wp**) e sem banho de acetona (**N**), sem pedipalpo (**np**) e lavados com acetona (**B**).

Tabela 11: Frequência relativa de cópula ou adoção de postura de copula em experimentos com machos **(M)** e fêmeas **(F)** com pedipalpos **(wp)** sem banho de acetona **(N)**, sem pedipalpo **(np)** e lavados com acetona **(B)**.

Tabela 12- Mortalidade de indivíduos de *L. intermedia* (N=4 para cada experimento) expostos a diferentes produtos em potes plásticos de 500 mL, 24, 48 e 96 h após a introdução dos indivíduos.

Tabela 13- Resultados dos experimentos para avaliar a ação repelente com arena. χ^2 , $P < 0,05$; χ^2 , $P < 0,01$; χ^2 , $P < 0,001$.

Tabela 14- Concentrações letais e relações de concentração dos pesticidas com melhor desempenho.

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1- Distribuição dos acidentes loxoscélicos conforme sexo em Curitiba, 1995 a 2005.

Gráfico 2- Distribuição dos acidentes loxoscélicos segundo local da picada Curitiba, 1995 a 2005.

Gráfico 3- Média de frequência de ocorrência dos padrões motores observados nos bioensaios.

Gráfico 4- Resultado dos teste comportamental realizado com acetato de geranila e geranil acetona.

Gráfico 5- Tempos de Knock down (KD) e Mortalidade (M) com papel filtro impregnado com Demand 2,5 CS (lambda-cialotrina microencapsulada 25 g/L).

Gráfico 6- Tempos de Knock down (KD) e Mortalidade (M) com papel filtro impregnado com Icon 5 CS (lambda-cialotrina 50 g/L).

Gráfico 7- Tempos de Knock down (KD) e Mortalidade (M) com papel filtro impregnado com K-Othrine CE 25 (Deltametrina 25 g/L).

Gráfico 8- Tempos de Knock down (KD) e Mortalidade (M) com papel filtro impregnado com Cymperator 25 CE (Cipermetrina 250 g/L).

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1- Mecanismo envolvido nos processos de conversão de álcoois e éteres metílicos em nitrilas.

LISTA DE SIGLAS, SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

ANOVA	- teste paramétrico
BHC	- hexaclorobenzeno
°C	- graus centígrados
CG-EM	- cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas
CG	- cromatografia gasosa
CL	- concentração letal
cm	- centímetros
dB	- deciBel
DDT	- 1,1-bis(4-clorofenil)-2,2,2-tricloroetano
E.M.	- espectro de massas
eV	- elétron-volt
g	- grama
h	- hora
HC	- hidrocarboneto
IE	- impacto de elétrons
IRA	- insuficiência renal aguda
L	- litro
m	- metro
µg	- micrograma
mL	- mililitro
µL	- microlitro
µm	- micrômetro
mm	- milímetro
m/z	- relação massa/carga
N	- número amostral
ng	- nanograma
n/N	- relação análise/efetivo
OMS	- Organização Mundial da Saúde
P	- probabilidade de erro
S	- substrato
SD	- desvio padrão
SL	- inclinação da curva

SNC	- sistema nervoso central
SPL	- nível de pressão sonora
NS	- não significativo
U	- teste de Mann-Whitney
W	- watts
χ^2	- qui-quadrado

RESUMO

Este trabalho esteve direcionado ao desenvolvimento de conhecimentos que permitissem avaliar, propor e estabelecer instrumentos de monitoramento e redução de populações de *Loxosceles intermedia* em Curitiba e região metropolitana e novos sítios de infestação.

O efeito dos principais pesticidas piretróides permitidos pela Organização Mundial da Saúde e empregados para o controle populacional de *L. intermedia* pelas empresas de controle de pragas foi pela primeira vez avaliado com metodologia apropriada. A metodologia utilizada buscou reproduzir condições mais próximas da realidade, ou seja, expor as aranhas em contato com substrato no qual foram aplicados os pesticidas e não a aplicação dos pesticidas diretamente no dorso dos animais, como em metodologias descritas em literatura. Os resultados obtidos evidenciaram o melhor desempenho do Demand 2,5 CS microencapsulado quando comparado com os demais, apresentando uma concentração letal (CL_{50}) de 0,023 % , aproximadamente 60 vezes menor que o de pior desempenho, devendo ser o pesticida de escolha, no caso de se optar por uma intervenção desta natureza.

Os produtos empregados pela população de Curitiba como repelentes-desalojantes de *L. intermedia* tiveram suas ações sistematicamente avaliadas, e novas combinações foram propostas. Entre os produtos que apresentaram resultado satisfatório destaca-se um produto de baixa toxicidade frente ao ser humano, identificado como XY. Foi determinado através de cromatografia gasosa e cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas que este produto

tem como componentes majoritários os compostos X e Y, que mostraram efeito repelente-desalojante tão bom quanto ao do produto XY. Dois outros compostos foram sintetizados em laboratório, um derivado do composto X e denominado de XD, e outro derivado do composto Y e denominado YD. A atividade de ambos os compostos derivados como possíveis repelentes-desalojantes também foram boas, com destaque para o derivado sintético YD, que mostrou 100 % de efetividade nos experimentos.

Os sinais acústicos-vibracionais emitidos no cortejo tanto por machos quanto pelas fêmeas foram registrados e caracterizados. Foi determinado através da técnica de microscopia eletrônica de varredura que os sinais estridulatórios foram produzidos, em ambos os sexos, pelo movimento ventro dorsal dos pedipalpos que causaram a fricção do pino estridulatório de encontro a sulcos retrolaterais das quelíceras.

Foi demonstrado que a comunicação química exerce papel importante no cortejo e cópula de *L. intermedia*. Uma série de compostos cuticulares foram identificados em ambos os sexos e parecem estar envolvidos com o reconhecimento da espécie, etapa que acontece através do toque das pernas dianteiras no corpo do parceiro, em etapa inicial do cortejo. Dois compostos identificados apenas nos extratos preparados tanto por aeração quanto pela lavagem dos corpos das fêmeas parecem estar relacionados com o reconhecimento do sexo.

ABSTRACT

This study aimed to develop information that will allow us to evaluate, propose and establish agents to monitor and reduce the populations of *Loxosceles intermedia* in Curitiba and its metropolitan region, and new infestation sites.

The effects of the principal pesticides allowed by the World Health Organization and used by pest-control companies to control populations of *L. intermedia* were evaluated for the first time by appropriate methodology. We attempted to reproduce conditions as naturally as possible, i.e., we exposed the spiders to contact with the substrate to which the pesticides were applied, rather than applying the pesticides directly to the dorsum of the animals, as is often described in the literature. The results obtained showed that microencapsulated Demand 2.5 CS performed best, with a lethal concentration (LC_{50}) of 0.023%, approximately 60 times lower than that of the worst-performing pesticide. This brand should be the pesticide of choice, in case this kind of intervention is selected.

The action of products that are used by the residents of Curitiba to repel and dislodge *L. intermedia* was systematically evaluated, and new formulations were proposed. Among the products that gave a satisfactory result, one, identified as XY, shows especially low toxicity to humans. Using gas chromatography and gas chromatography combined with mass spectrometry, we determined that the main components of this product are X and Y, which showed a repellent-dislodging effect as good as that of product XY. Two additional compounds were synthesized in the laboratory, one derived from compound X and termed XD, and the other

derived from compound Y and termed YD. Both compounds also showed good repellent-dislodging activity, especially the synthetic derivative YD which was 100% effective.

The acoustic-vibration signals emitted during courtship by males and females were recorded and characterized. By scanning electron microscopy we determined that both sexes produce stridulations by ventro-dorsal movements of their pedipalps, causing the stridulatory pick to rub against the retrolateral sulci of the chelicerae.

We also demonstrated that chemical communication plays an important role in courtship and mating of *L. intermedia*. In both sexes, several cuticular compounds were identified that appear to be involved in species recognition, the stage of initial courtship when the anterior legs touch the partner's body. Two compounds, identified only in extracts prepared by aeration as well as by washing the bodies of females, appear to be related to sex recognition.

I- INTRODUÇÃO

I.1- ASPECTOS GERAIS SOBRE ARANHAS

Entre os invertebrados, o filo Arthropoda destaca-se por apresentar dois grandes grupos, Insecta e Araneae com grande diversidade de espécies. A Ordem Araneae, Classe Arachnida, posiciona-se em sétimo lugar no tocante à riqueza e abundância de espécies. O grupo pode ter surgido no final do período Siluriano ou início do Devoniano tendo ocorrido, provavelmente, a maior radiação de Araneomorphae no final do Paleozóico ou início do Mesozóico (Coddington & Levi, 1991). O fóssil mais antigo de aranha data do Devoniano Médio (Selden *et al.*, 1991).

Atualmente, presentes em todos os tipos de ecótopos, esses aracnídeos contribuem para a biodiversidade global com aproximadamente 40.000 espécies descritas, distribuídas em 110 famílias (Platnick, 2007) e em duas subordens: Mesothelae, cujas 87 espécies, agrupadas em 5 gêneros de uma única família, Liphistiidae, ocorrem apenas na Ásia; Opisthothelae que contém as demais espécies de aranhas (Platnick, 2007).

A sub-ordem Opisthothelae contém duas infraordens: Araneomorphae e Mygalomorphae (Platnick & Gertsch, 1976). As migalomorfas ou aranhas-caranguejeiras estão reunidas em 15 famílias (Raven, 1985) e 308 gêneros enquanto as araneomorfas ou aranhas-verdadeiras representam 93% das espécies descritas contidas em 94 famílias e 3.252 gêneros (Platnick, 2007).

Presentes em todos os continentes, exceto na Antártida, as aranhas são importantes componentes dos diversos ecossistemas terrestres, adaptando-se inclusive ao ambiente antrópico. Sua estratégia trófica, a predação, tem importância direta para o homem, uma vez que as populações de insetos, sua principal presa, são por elas reguladas tanto no ambiente natural quanto no ambiente antrópico, o que as torna importantes no controle de pragas agrícolas e vetores de afecções ao homem (Coddington & Levi, 1991). Além de insetos podem alimentar-se de outros artrópodes e pequenos vertebrados, como filhotes de pássaros e roedores (Foelix, 1996).

De maneira geral, todas as aranhas são venenosas, excetuando-se apenas espécies pertencentes à família Uloboridae que perderam, secundariamente, seu veneno. O aparecimento do veneno provavelmente tenha se dado já no início do decurso evolutivo das aranhas podendo a variação na toxicidade estar associada à teia, que teria surgido como ferramenta auxiliar para captura das presas (Glatz, 1969). Embora o veneno de cada espécie possa ser mais ou menos tóxico para insetos ou outros invertebrados ou vertebrados, incluindo o homem, a atividade da gama variável de venenos dentro da diversidade de aranhas é ainda pouco estudada. A Organização Mundial da Saúde considera somente espécies de quatro gêneros de aranhas como responsáveis por envenenamentos graves ao homem: *Atrax* (Mygalomorphae, Hexathelidae), *Latrodectus* (Araneomorphae, Theridiidae), *Phoneutria* (Araneomorphae, Ctenidae) e *Loxosceles* (Araneomorphae, Sicariidae) (WHO, 1981).

Afecções: doenças (independente da causa).

Antrópico: resultante ação do homem.

No Brasil estão presentes representantes de três dos quatro gêneros considerados pela OMS como de importância médica: *Phoneutria*, *Latrodectus* e *Loxosceles* devido ao envolvimento dessas aranhas em casos de acidentes com humanos.

I.2- CARACTERÍSTICAS GERAIS SOBRE O GÊNERO *Loxosceles*

O gênero *Loxosceles* (Heineken & Lowe, 1832) compõe, com o gênero *Sicarius* (Walckenaer, 1847), a família Sicariidae (Keyserling 1880), nome considerado sinônimo de Loxoscelidae por Platnick *et al* (1991). Ambos os gêneros contêm espécies de importância em saúde, pelo fato do veneno induzir reações locais e/ou sistêmicas, graves em alguns casos.

As espécies de *Sicarius* estão presentes na América Central e Sul, Namíbia e África do Sul enquanto as de *Loxosceles* apresentam distribuição mundial, com espécies endêmicas na América e África (Platnick, 2007).

Atualmente 100 espécies estão descritas para toda a região Neotropical, Europa, Ásia e África, 10 delas presentes e/ou endêmicas do Brasil - *L. adelaida*, *L. amazonica*, *L. anomala*, *L. gaucho*, *L. hirsuta*, *L. immodesta*, *L. intermedia*, *L. laeta*, *L. puortoi* e *L. similis* (Platnick, 2007).

As *Loxosceles* são aranhas pequenas (1 a 1,5 cm de corpo), com pernas finas e longas. Apresentam seis olhos com disposição característica - em forma de três díadas, conforme mostrada na **Figura 1**.



Figura 1- Ampliação do cefalotórax de uma *Loxosceles*, com ênfase nos três pares de olhos.

De hábitos noturnos, são sedentárias e não agressivas, preferindo a escuridão, algumas vivem sob pedras, troncos de árvores, restos vegetais, telhas e tijolos empilhados, não apreciam ambientes úmidos. Algumas espécies apresentam hábitos intradomiciliares e podem ser encontradas atrás de quadros e móveis, no meio de roupas, livros, caixas de papelão e outros objetos.

Aranhas deste gênero recebem também a denominação popular de aranha-marrom por seu colorido uniforme que varia do marrom claro até o marrom escuro. Variações nesta coloração podem ajudar na identificação de algumas espécies como a *L. gaucho*, que apresenta uma mancha clara em forma de estrela no cefalotórax (Figura 2a) ou a espécie *L. laeta*, com uma mancha escura na mesma região (Figura 2b).



(a)



(b)

Figura 2- Aranhas do gênero *Loxosceles*. Figura (a) macho da espécie *L. gaucho* e Figura (b) macho da espécie *L. laeta*.

I.3- DADOS BIOLÓGICOS E ECOLÓGICOS RELACIONADOS AO GÊNERO *Loxosceles*

I.3.1- REPRODUÇÃO

Nas aranhas os espermatozóides produzidos nos testículos dos machos passam por um conjunto de canais e atingem o exterior através da fenda genital, situada na região ventral do abdômen. Estes são captados pelos pedipalpos modificados, que no momento da cópula, têm seus bulbos inseridos na fenda genital da fêmea, sendo os espermatozóides depositados no interior das espermatecas, onde podem ficar estocados por prolongados períodos de tempo (Uhl, *et al.*, 1994). O epitélio da espermateca tem função glandular e produz uma secreção cuja função ainda não é bem conhecida. O fato de que os espermatozóides podem ficar estocados por meses neste ambiente, sugere um papel nutritivo para a secreção da espermateca. A *L. intermedia* se reproduz preferencialmente nos meses mais quentes do ano, podendo depositar uma média de 20 ovos por postura (Andrade *et al.*, 1999). A fêmea constrói uma teia complexa, a ooteca em formato de saco, onde os ovos são acondicionados no momento da postura. As fases iniciais do desenvolvimento embrionário para esta espécie foram investigadas por Ferreira *et al* (2001), sendo que a fêmea da aranha-marrom copula uma única vez com o macho, guardando seus

espermatozóides para utilizá-los em até seis vezes, sempre que encontrar situações apropriadas para a desova, dos quais eclodem as aranhas jovens em 46 dias (Fischer 1996).

Após a eclosão, as pré-larvas sofrem ainda duas mudas antes de deixar a ooteca em busca de alimento, mais 4 a 7 mudas ocorrerão antes que os animais atinjam a maturidade sexual (molt final), aproximadamente um ano (Fischer, 1996). A fecundação nas aranhas é um assunto pouco explorado e controverso, Valente *et al* (1984) discutem a fecundação como sendo um processo externo, uma vez que a fêmea é observada liberando os ovos e um líquido de modo intercalado, fechando posteriormente a ooteca e a girando como se estivesse misturando os ovos com a secreção.

Epitélio: tecido formado por várias camadas de células.

1.3.2- TEIAS PRODUZIDAS PELA ESPÉCIE *L. intermedia*

Aranhas do gênero *Loxosceles* constroem uma teia que recobre o substrato de forma irregular (**Figura 3a**), descrita como tendo o aspecto de algodão esfiapado (Eickstedt, 1994). As teias de *Loxosceles* possuem uma grande capacidade de retenção de presas e persistência da adesividade por longos períodos, sendo comum encontrar presas das mais diferentes taxas de peso em suas teias (Levi & Spielman, 1964). Produzem dois tipos de fios: um cilíndrico, com cerca de 15 µm de diâmetro (**Figura 3b**), e outro em forma de “fita”, aparentemente exclusivo do gênero (**Figura 3c**) (Stern & Kullmann, 1981). As fitas, denominadas “Fadenbänder” no trabalho original, se apresentam em grande

densidade, enoveladas em meio aos fios cilíndricos. Quando abertas as fitas medem cerca de 3 μm de largura por 0,02 μm de espessura (Stern & Kullmann, 1981). As fitas podem apresentar-se enroladas no sentido longitudinal (aspecto de tubo com sulco longitudinal) quando tensionadas até parcialmente ou totalmente abertas e enoveladas quando não tensionadas (Ramires, 2000, 2002). As revisões bibliográficas e trabalhos sobre o gênero *Loxosceles* publicadas após 1981 não citam este tipo de fita de seda. O relato de Stern e Kullmann ficou “perdido” na literatura durante este período, não sendo citado em nenhuma revisão ou trabalho publicado sobre o gênero *Loxosceles* após 1981. Há possibilidade que este fio de seda em forma de fita possa explicar a grande adesividade de teias de *Loxosceles*.

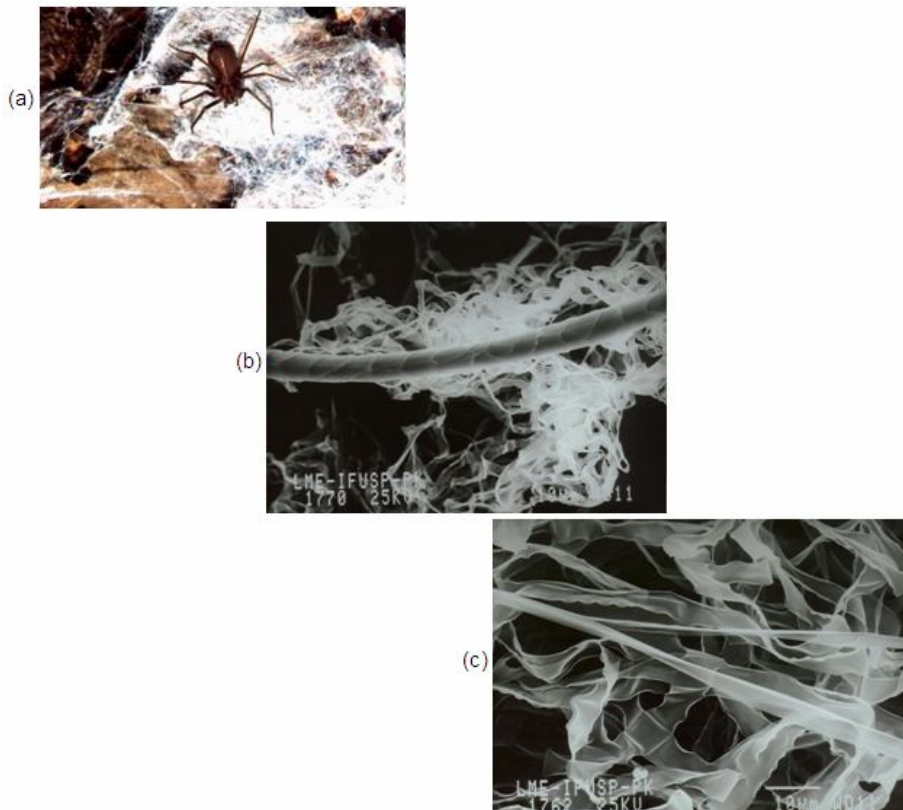


Figura 3- Foto (a), teia de uma fêmea de *L. intermedia* em estado natural. As micrografias (b) e (c) foram obtidas a partir de microscopia eletrônica de varredura.

O estiramento da teia ocorre à medida que a aranha se move para longe a partir de um cordão ancorado ou então puxa os cordões com suas pernas superiores. As aranhas produzem mais de um tipo de seda, e vários tipos são secretados a partir de seis tipos diferentes de glândulas.

I.3.3- CONSTITUIÇÃO QUÍMICA DAS TEIAS

A constituição química da seda é formada por um complexo de proteínas formado predominantemente por: glicina, alanina, serina e tirosina, denominada genericamente por fibroína, **Figura 5**.

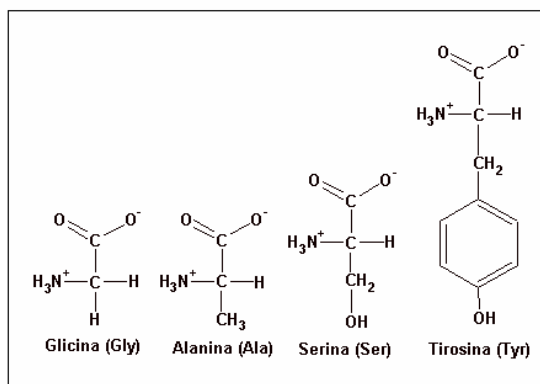


Figura 5- Principais aminoácidos que constituem a composição química da teia das aranhas.

Outros aminoácidos fazem parte da constituição proteica responsável pela seda, porém em uma quantidade desconsiderável em relação aos citados.

Nem todas as aranhas constroem teias para capturar suas presas, sendo que a principal função da seda é reprodutiva, na construção do estojo ovífero sedoso (ovisaco), isso por parte da fêmea. Já o macho utiliza a teia para fazer o transporte do sêmen para os órgãos copuladores. Outra função é a de "*linha reboque*", onde uma linha de seda serve como dispositivo de movimentação e segurança para a aranha. A seda da teia é mais fina que um fio de cabelo, mais leve que o algodão, e (nas mesmas dimensões) mais forte que o aço.

I.3.3.1- CONFORMAÇÃO ESTRUTURAL DAS TEIAS

A seda das teias possui estrutura secundária do tipo folha β , ou seja, um arranjo tridimensional do tipo folha pregueada ou folha dobrada. Neste sistema se estabelecem ligações de hidrogênio entre seus grupos N-H e C=O, conforme observado na **Figura 4**.

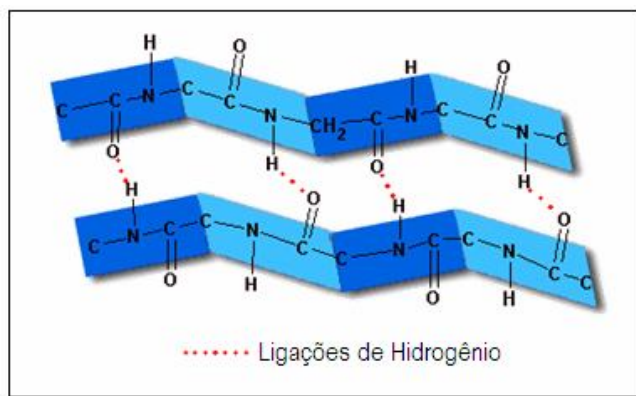


Figura 4- Estrutura secundária do tipo β - conformação.

I.4- TAXONOMIA DO GÊNERO *Loxosceles*

Tradicionalmente, a taxonomia de *Loxosceles* tem sido baseada somente em caracteres morfológicos. Walckenaer (1847) foi quem mencionou pela primeira vez uma espécie do gênero *Loxosceles* na América do Sul ao transferir *Scytodes rufipes*, para *Loxosceles rufipes* (Lucas, 1834).

Simon (1907) foi autor da primeira revisão das espécies sul-americanas do gênero descritas até então. Outros autores como Camargo (1953), Mello-Leitão (1918, 1934, 1944) e Bücherl (1956, 1960a, 1960b, 1960c, 1964a e 1964b) acrescentaram dados à taxonomia do gênero.

Um dos trabalhos mais relevantes sobre as *Loxosceles* da América do Sul é o de Gertsch (1967). Neste artigo, o autor faz descrição de 3 novas espécies endêmicas no Brasil - *L. gaucho*, *L. adelaida* (somente a fêmea) e *L. amazonica*. Descreveu ainda *L. alicia*, *L. blancasi*, *L. conococha*, *L. frizzelli*, *L. harrietae*, *L. herreri*, *L. inca*, *L. olmea*, *L. piura*, *L. pucara*, *L. rosana*, *L. surca*, *L. weyrauchi* para o Peru; *L. coquimbo* para o Chile e *L. gloria* para o Equador. Após Gerstch (1967) pouco foi acrescentado à taxonomia de *Loxosceles*. Alguns autores adicionaram dados à distribuição geográfica ao relatar o encontro de espécies já anteriormente descritas em localidades diferentes das localidades típicas.

Toda a taxonomia de *Loxosceles*, como já mencionado, está baseada exclusivamente em caracteres morfológicos, e nenhum estudo sobre as relações de parentesco entre os táxons foi realizado até o momento. Os autores têm adotado os grupos de espécies propostos por Gertsch (1967) sem que o

monofiletismo destes tenha sido verificado por nenhum deles até então. Uma revisão taxonômica das espécies do gênero presentes no Brasil faz-se necessária como contribuição ao entendimento da história evolutiva do grupo.

Taxonomia: Ciência que classifica organismos.

Táxons: unidades sistemáticas numa classificação.

Monofiletismo: teoria biológica, que para cada uma espécie admite-se apenas um tronco genealógico.

I.5- FILOGENIA DAS ESPÉCIES DE *Loxosceles* PRESENTES NO BRASIL

As informações filogenéticas para espécies do gênero *Loxosceles* são inexistentes, nenhum estudo tem sido realizado, nem por meio de análise morfológica e nem molecular. Em busca do entendimento do processo de especiação e do processo de sinantropização das *Loxosceles* endêmicas do Brasil, faz-se necessário a análise das relações inter e intra-específicas de 7 das 10 espécies presentes no Brasil: *L. adalaida*, *L. gauchoi*, *L. intermedia*, *L. hirsuta*, *L. laeta* e *L. puortoi*, *L. similis* a partir de dados morfológicos, distribuição geográfica e características do veneno e da ação de cada um deles em humanos.

I.6- *Loxosceles* E O AMBIENTE CÁRSTICO

As espécies de *Loxosceles* de importância médica, *L. intermedia*, *L. laeta* e *L. gaucho*, pertencem à fauna de aracnídeos sinantrópicos do Brasil. Estas aranhas têm sido objeto de estudo, principalmente no que concerne ao envenenamento por elas causado, sendo poucos os estudos que versam sobre sua sistemática, biologia e ecologia (Levi & Spielman, 1964; Gertsch, 1967; Lowrie, 1980, 1987; Fischer, 1996; Rinaldi *et al.*, 1997; Gonçalves-de-Andrade *et al.*, 2000).

Cárstico: relevo de corrosão geológica, caracterizado pela formação de cavernas.

Filogenia: evolução da espécie.

Sinanthropização: animais silvestres que se aproximam do homem.

Endêmicas: que ocorrem na região.

De acordo com Trajano (1987) estas aranhas figuram entre os representantes da fauna hipógea brasileira e estão entre os aracnídeos mais comuns neste ambiente, como elemento troglófilo. A presença marcante dessas aranhas nos carstes já estudados pelos autores acima citados, justifica mapear a presença de *Loxosceles* também nesse ecossistema, principalmente por ser o Brasil um país rico em áreas cársticas.

I.7- ESPÉCIES DE *Loxosceles* PRESENTES NA REGIÃO SUL DO BRASIL

As aranhas do gênero *Loxosceles* têm vasta distribuição pelo mundo tropical, subtropical e temperado, principalmente no Continente Americano. São encontradas na América do Sul (Sezerino *et al.*, 1998; Schenone, 1998), América do Norte (Futrell, 1992; Escalante-Galindo *et al.*, 1999), Europa (Nicholson & Gaudins, 2003), África (Futrell, 1992; Nicholson & Gaudins, 2003), Oriente Médio e algumas regiões da Ásia (Nicholson & Gaudins, 2003), Israel (Borkkan *et al.*, 1995; Cohen *et al.*, 1999) e Austrália (Young & Pincus, 2001; Nicholson & Gaudins, 2003). Existem mais de 50 espécies nas Américas do Norte e do Sul (Futrell, 1992; da Silva *et al.*, 2004). Na região sul do país, principalmente no Estado do Paraná e mais especificamente na cidade de Curitiba e região metropolitana, são encontradas quatro espécies do gênero *Loxosceles* (Gertsch e Ennik, 1983).

1. ***Loxosceles gaucho*** - Encontrada no Brasil (São Paulo, Minas Gerais, Paraná e Santa Catarina) e na Tunísia.
2. ***Loxosceles hirsuta*** - Encontrada no Brasil (São Paulo, Paraná, Rio Grande do Sul e Minas Gerais), Paraguai e Argentina.
3. ***Loxosceles intermedia*** - Encontrada no Brasil (regiões sul e sudeste e no Estado de Goiás). Conhecida também por *L. ornatus* e *L. ornata*, sendo esta a mais abundante na região sul. Também encontrada na Argentina.
4. ***Loxosceles laeta*** - Encontrada no Brasil, na Finlândia, e na Austrália. (No Brasil possui maior ocorrência nas regiões sul e sudeste e no Estado da Paraíba). Também conhecida por *L. bicolor*, *L. longipalpis*, *L. nesophila* e *L. yura*.

A *L. intermedia* é a espécie mais abundante em Curitiba e região metropolitana com aproximadamente 90% da população, sendo os outros 10% referentes às outras três espécies.

Hipógea: localizada abaixo da terra.

Troglófilo: prefere viver em cavernas subterrâneas (grutas).

1.8- *Loxosceles intermedia*

Das quatro espécies encontradas na região sul do país, a *L. intermedia* parece ser a que melhor se adaptou ao ambiente urbano. As espécies de *Loxosceles* são araneofágicas (Levi & Spielman 1964), predando aranhas de sua espécie ou de outras.

Estudos de mapeamento de acidentes loxoscélicos (Manfredini *et al.* 1993, dados da Secretaria Municipal de Saúde de Curitiba) indicam que a espécie *L. intermedia* está disseminada por toda a área urbana de Curitiba e região metropolitana. A distribuição de casos de acidentes é heterogênea, com maior frequência de acidentes longe de áreas verdes. A espécie *L. intermedia* desloca-se com maior frequência e/ou a maiores distâncias da teia que *L. gaucho* ou *L. laeta* durante a noite, ou muda com maior frequência o local de construção de sua teia, aumentam as chances de encontros com humanos e, portanto acidentes.

A espécie apresenta dimorfismo sexual, sendo normalmente as fêmeas maiores em tamanho corporal que os machos, **Figura 6**. Aranhas da espécie *L. intermedia* são aranhas haplóginas, cujos órgãos reprodutores não são visíveis externamente.



(a)



(b)

Figura 6- Aranhas do gênero *Loxosceles*, espécie *intermedia*. Figura **(a)** fêmea e **(b)** macho.

As fêmeas alcançam à maturidade sexual em média aos 328,5 dias e machos em 454,7 dias. Uma fêmea pode produzir até 15 ootecas que contêm de 22 a 138 ovos. Indivíduos adultos podem sobreviver sem água e sem alimento por mais de seis meses e acasalam-se durante todo o ano, construindo ootecas uma seguida da outra (Fischer, 1994).

I.9- LOXOSCELISMO

Nome dado ao acidente provocado por aranha-marrom. O primeiro caso documentado de loxoscelismo ocorreu em 1879 no Tennessee (Estados Unidos). Contudo dados mais concretos foram colhidos no Chile pelo médico chileno Macchiavello (Bücherl, 1961), que comprovou ser *L. laeta* a responsável pelo “arañismo cutáneo-gangrenoso y hemolitico do Chile”. A grande sinantropia das aranhas aproximou-as dos seres humanos levando a um aumento dos casos de envenenamento e chegando a ser considerado um problema de saúde pública no Brasil, Chile e Estados Unidos da América (Schenone, 1998; Sezerino *et al.*, 1998; Nicholson & Graudins, 2003). No Brasil os primeiros registros de acidentes loxoscélicos datam de 1954 (Eickstedt, 1994). O loxoscelismo, em nosso País, concentra-se na região sul. No Paraná o loxoscelismo constitui-se a forma mais importante de araneísmo, em contraste com São Paulo, onde menos de 10% dos

acidentes araneídicos são atribuídos a espécies de *Loxosceles* conforme dados apresentados na **Tabela 1** (Albuquerque *et al.*, 1990). Os acidentes loxoscélicos no Brasil começaram a ser reconhecidos em 1954, por Bücherl e Rosenfeld. Posteriormente, outros trabalhos como os de Furlanetto (1961) e Furlanetto *et al.*, (1962) contribuíram para caracterização do gênero e produção de soro antiveneno específico. Entre 1990 e 1993, no Brasil foram registrados 17.785 acidentes araneídicos onde 36,6% atribuídos à aranha-marrom (6.512 casos), sendo 6.224 (95,6%) dos casos de ocorrências na região sul do país (dados do Ministério da Saúde), tornando o loxoscelismo o mais importante dos casos de envenenamento envolvendo aranhas.

Sinantropia: adaptação de animais silvestres ao meio urbano.

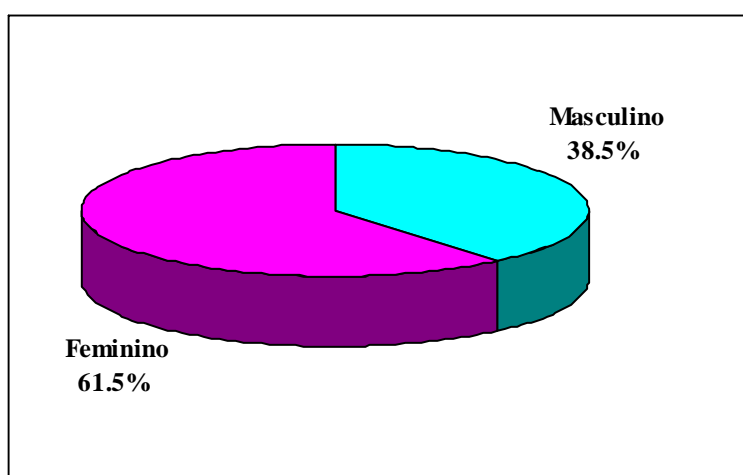
Tabela 1- Distribuição do loxoscelismo, por macro Região. Brasil, 2001 a 2005.

Região/ano	2001	2002	2003	2004	2005
Norte	17	29	190	96	56
Nordeste	14	20	45	50	48
Sudeste	134	199	196	257	231
Sul	5.581	6.335	7.567	7.491	5.389
Centro-Oeste	3	11	19	14	14
Brasil	5.749	6.594	8.017	7.908	5.738

Fonte: Secretaria de Vigilância em Saúde - Ministério da Saúde

Entre os acidentados, pessoas do sexo feminino são mais frequentemente picadas, o **Gráfico 1**, apresenta a relação proporcional entre pessoas do sexo masculino e feminino vítimas de picada de aranha-marrom.

Gráfico 1- Distribuição dos acidentes loxoscélicos conforme sexo em Curitiba, 1995 a 2005.



Fonte: Secretaria de Estado da Saúde (SESA)- Pr

I.9.1- LOXOSCELISMO NO ESTADO DO PARANÁ

No Brasil o Loxoscelismo não é muito freqüente, com exceção do Estado do Paraná, particularmente em Curitiba e região metropolitana, onde, conforme já mencionado, a espécie predominante é *L. intermedia*. É provável que o aumento do número de acidentes envolvendo a aranha-marrom em Curitiba e região metropolitana nos últimos anos deva-se a desequilíbrios ambientais e ecológicos, tais como: desmatamentos e extinção de predadores naturais, o que poderia impedir a manutenção da densidade populacional da espécie em níveis estáveis (Barbaro *et al.*, 1995).

da-Silva & Fischer (2005) estudaram a casuística sobre loxoscelismo no Paraná, analisando 20.620 casos de acidentes registrados em apenas oito anos (entre 1993 e 2000). Estes casos estavam distribuídos em 175 municípios paranaenses (43,9% dos municípios). Marcantemente, 92,61 % dos casos foram registrados na região metropolitana de Curitiba e se concentraram nos períodos mais quentes do ano. O local mais freqüente de picada em habitantes tanto da zona rural como urbana é membro inferior, seguido por membro superior. Dados colhidos junto ao SESA-Pr (Secretaria de Estado da Saúde do Paraná) mostram que nos casos de loxoscelismo registrados entre 1995 e 1999 as alterações sistêmicas mais freqüentes foram tonturas (21%), sonolência (19%), sede (20%), “rash” cutâneo (19%), náusea (18%), mal estar (25%) e cefaléia (30%).

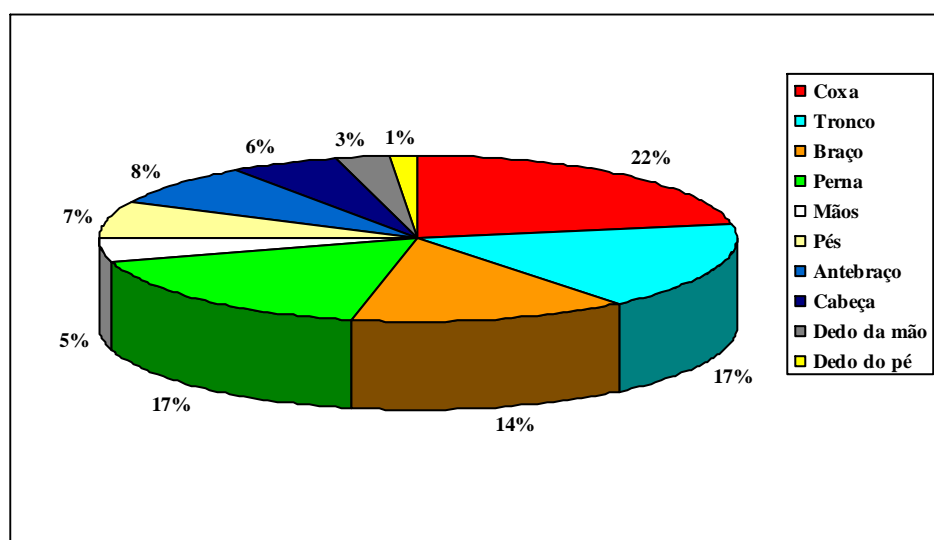
Rash: rompimento cutâneo da pele.

I.10- FORMA E CONSEQUÊNCIA DOS ATAQUES ENVOLVENDO ARANHAS DO GÊNERO *Loxosceles*

As aranhas do gênero *Loxosceles* são pouco agressivas, dificilmente atacam pessoas. As picadas ocorrem como forma de defesa e a maioria dos acidentes (cerca de 80%) acontecem dentro de casa, quando macho ou fêmea (ambos peçonhentos) são comprimidos contra o corpo, durante o sono, no momento em que se veste roupas e calçados ou no manuseio de objetos guardados em locais escuros.

O **Gráfico 2**, apresenta os locais do corpo e suas respectivas relações percentuais com relação a picadas por aranha-marrom.

Gráfico 2- Distribuição dos acidentes loxoscélicos segundo local da picada Curitiba, 1995 a 2005.



Fonte: Secretaria de Estado da Saúde (SESA)- Pr

I.11- NÍVEIS E CARACTERÍSTICAS DAS PICADAS DE ARANHAS DO GÊNERO *Loxosceles*

O veneno de aranhas do gênero *Loxosceles* possui forte ação proteolítica e hemolítica, podendo causar acidentes graves com seres humanos (Cardoso 1990).

De acordo com Oliveira *et al.* (2005) existem variações significativas na composição do veneno das diferentes espécies de *Loxosceles*. Estas variações podem afetar a eficácia do soro anti-aracnídico administrado em caso de acidentes (Pretel *et al.*, 2005). Frente a essa variabilidade na composição e ação das toxinas das espécies de *Loxosceles* verifica-se a importância da caracterização dessas, associada à identificação precisa das espécies do grupo.

A gravidade da picada envolvendo acidentes Loxoscélicos pode ser caracterizada em três estágios.

Ação proteolítica: promove quebra das proteínas

Ação hemolítica: promove a destruição das hemácias (células vermelhas)

- **Caso leve**

- **Características:** lesão cutânea (vermelhidão, formação de bolha, edema discreto) com ou sem dor/queimação, endurecimento da região. Não há comprometimento do estado geral da vítima.

- **Caso moderado**

- **Características:** Endurecimento da região, equimose e dor em queimação de início precoce (até 48 horas); dores de cabeça e musculares.

- **Caso grave**

- **Características:** isquemia, placa marmórea, necrose ou bolha hemorrágica de rápida instalação (nas primeiras 36 horas), acompanhadas de endurecimento e dor em queimação, além de alteração clínica confirmada laboratorialmente, podendo levar a vítima a óbito.

Não foram executadas biópsias consecutivas do desenvolvimento do loxoscelismo cutâneo em humanos. Porém, as mudanças histopatológicas incluem edema e espessamento do endotélio dos vasos sanguíneos, presença de células inflamatórias, vasodilatação, coagulação intravascular, degeneração da parede dos vasos sanguíneos, hemorragia dérmica e até mesmo subcutânea (Futrell, 1992, da Silva *et al.*, 2004).

Cerca de 25% dos acidentes em Curitiba ocorrem durante o sono (SESA-Pr), indicando que tenha havido movimentação das aranhas durante a noite. Dados epidemiológicos não incluem a determinação do sexo das aranhas, não permitindo

dizer se há maior frequência de machos se deslocando à procura de fêmeas. Observações pessoais noturnas em Curitiba invariavelmente detectaram machos, fêmeas e jovens de *L. intermedia* se deslocando, no período noturno.

O número de acidentes loxoscélicos no Paraná é considerado um problema sério de saúde pública, notadamente na cidade de Curitiba (Ribeiro *et al.*, 1993), onde predomina *L. intermedia*, sendo que não existem dados paralelos em nenhuma outra região do mundo. Os acidentes loxoscélicos envolvem o quadro dermonecrótico ou cutâneo (84-97% dos casos), e o quadro cutâneo-visceral ou sistêmico (3-16% dos casos), sendo este último mais grave, podendo a vítima entrar em óbito.

Equimose: infiltração do sangue na malha dos tecidos.

Isquemia: falta de suprimento sanguíneo

I.12- QUADRO DERMONECRÓTICO OU CUTÂNEO

O quadro cutâneo caracteriza-se por dermonecrose no local da inoculação do veneno (Rees, *et al.*, 1984). A picada inicial, por ser pouco dolorosa, geralmente passa despercebida pelo paciente, após 2 a 8 horas, a dor pode variar de moderada a severa e é descrita como dor local do tipo “queimação” ou ardência. Pode ser acompanhada por prurido, edema, eritema, sensação de mal-estar geral e podendo em alguns casos ocorrer febre. Em seguida, pode surgir uma lesão de 1 a 30 cm de diâmetro, circundada por um halo vermelho e uma zona pálida, denominada placa marmórea (Rodrigues *et al.*, 1986; Futrell, 1992). Após período entre 3 a 5 horas do acidente pode ocorrer acúmulo de leucócitos polimorfonucleares, os quais participam do surgimento e desenvolvimento do quadro dermonecrótico (Futrell, 1992; Ospedal, *et al.*, 2002; da Silva *et al.*, 2004). Em alguns casos a lesão cutânea necrótica evolui em 2 a 6 semanas, com formação de uma escara de difícil cicatrização e pode dar origem a seqüelas deformantes de importância (Futrell, 1992; da Silva *et al.*, 2004).

O estudo histopatológico detalhado da dermonecrose induzida por veneno de *L. intermedia* em coelhos, **Figura 7**, mostra o aparecimento de injúria tecidual a partir de 4 horas após a injeção do veneno chegando a um pico máximo de dano tecidual, inclusive com lise dos tecidos mais profundos que a derme (mionecrose e necrose coagulativa) em 5 dias, com aparecimento de tecido conjuntivo de reparo (Ospedal *et al.*, 2002), além de lesão de vasos sangüíneos com aparecimento de bolhas no endotélio, fibrinogenólise e trombose (Veiga, *et al.*, 2001a; Veiga, *et al.*, 2001b; Zanetti *et al.*, 2002).

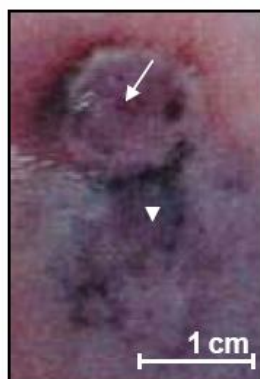


Figura 7- Lesão dermonecrótica em coelho provocada pelo veneno de *L. intermedia*.

A seta na figura indica o local onde foi injetado o veneno e a cabeça de seta indica que houve espalhamento gravitacional. Após um período de 3 a 5 dias do acidente, pode ocorrer necrose e formação de abscesso (Smith & Micks, 1970; Futrell, 1992).

A necrose formada pode ser determinante para o advento de outros problemas, como por exemplo, a contaminação secundária da ferida por agentes bacterianos e fúngicos patogênicos. Estudos recentes têm mostrado que a contaminação da lesão dermonecrótica com microrganismos anaeróbios tais como *Clostridium perfringens*, presentes na própria quelícera da aranha potencializam o efeito dermonecrótico proporcionado pelo veneno (Monteiro *et al.*, 2002). Efeitos da ativação plaquetária induzidos pela toxina da aranha-marrom na microcirculação podem ser responsáveis pela trombose vascular, isquemia tecidual e perda da pele no local da picada (Futrell, 1992; da Silva *et al.*, 2004).

Além disso, componentes plasmáticos também parecem ser requeridos para efeitos nocivos do veneno (Rees *et al.*, 1988).

Em alguns casos a lesão cutânea necrótica evolui em 2 a 6 semanas, com formação de uma ferida de difícil cicatrização que pode dar origem à seqüelas deformantes, como as observadas na **Figura 8** (Pizzi *et al.*, 1957).

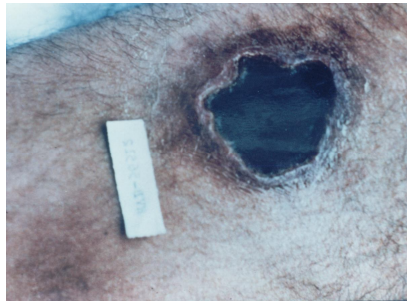


Figura 8- Lesão cutânea necrótica, com formação de ferida de difícil cicatrização e que pode originar seqüelas deformantes.

Prurido: coceira

Eritema: coloração vermelha na pele

I.13- QUADRO CUTÂNEO-VISCERAL OU SISTÊMICO

O loxoscelismo cutâneo-visceral é menos freqüente, atingindo 3-16% dos casos e com as primeiras manifestações ocorrendo geralmente nas primeiras 24 horas pós-acidente (Schenone & Letonja, 1975; Martinez-Vargas, 1987; Schenone, 1989; Futrell., 1992; Coutinho, 1996; da Silva *et al.*, 2004). As manifestações incluem o aparecimento de astenia, febre, cefaléia, alterações sensoriais, insônia, alterações no quadro hematológico com possibilidade de levar à coagulação intravascular disseminada, agregação plaquetária e anemia hemolítica, podendo chegar eventualmente ao coma (Forrester *et al.*, 1978; Bascur *et al.*, 1982; Ress *et al.*, 1988; da Silva *et al.*, 2003; da Silva *et al.*, 2004).

Em casos onde o processo torna-se sistêmico, o quadro em geral evolui para uma insuficiência renal aguda (IRA), tendo sido registrado vários óbitos, principalmente entre crianças e/ou pessoas de saúde delicada ou idosos (Barbaro, *et al.*, 1995; da Silva *et al.*, 2004).

I.14- CARACTERÍSTICAS BIOQUÍMICAS DOS VENENOS DE *L. intermedia*

O veneno da aranha-marrom, é um líquido protéico, produzido por glândulas apócrinas situadas no cefalotórax do animal, as quais comunicam-se com o exterior através do aparelho inoculador, constituído por um par de quelíceras (Gajardo & Tobar, 1966; Martinez & Vargas, 1987; dos Santos *et al.*, 2000; da Silveira *et al.*, 2002). A atividade biológica de três espécies de aranhas

do gênero *Loxosceles* no Sul do Brasil foi estudada por Barbaro *et al.* (1996), os quais reconheceram que o veneno de *L. intermedia* é o mais letal para camundongos, seguido do veneno de *Loxosceles gaucho* e finalmente o veneno de *L. laeta*. Nas aranhas do gênero *Loxosceles* o veneno apresenta alguma ação enzimática proteolítica e por isso pode ser comparado a alguns venenos de serpentes, onde os estudos demonstraram a presença de enzimas em sua composição (Martinez & Vargas, 1987). No gênero *Loxosceles* a presença destas proteases foi detectada no extrato da glândula de *L. intermedia* descartando-se a contaminação por egesto digestivo, que poderia estar presente na coleta por eletrochoque (da Silveira *et al.*, 2002).

Vários constituintes incluindo hialuronidases, serino proteases, metaloproteases e esfingomielinase-D foram identificadas no gênero *Loxosceles* (Futrell, 1992; Feitosa *et al.*, 1998; Veiga *et al.*, 2000a; Young & Pincus, 2001; da Silva *et al.*, 2004). Esfingomielinase-D, ou toxina dermonecrótica, em condições de laboratório mostrou ser capaz de produzir hemólise, agregação plaquetária, distúrbios renais, dermonecrose em coelhos e resposta inflamatória no local da injeção (Futrell, 1992; da Silva *et al.*, 2004; Chaim *et al.*, 2006). Atualmente se sabe que a esfingomielinase-D compreende uma família de toxinas presentes nas espécies do gênero *Loxosceles* (Futrell, 1992; Tambourgi *et al.*, 1995; Barbaro *et al.*, 1996; da Silva *et al.*, 2004; Binford *et al.*, 2005; Chaim *et al.*, 2006). Metaloproteases foram primeiramente identificadas no veneno de *L. intermedia* como descrito por Feitosa *et al.*, 1998. Estes autores descrevem duas moléculas no veneno denominadas Loxolisina A (20-28kDa) com atividades fibronectinolítica

e fibrinogenolítica e Loxolisina B (32-35kDa), com atividade gelatinolítica. As atividades fibronectinolítica, fibrinogenolítica e gelatinolítica dependentes de metaloproteases foram comprovadas por da Silveira *et al* (2002) em extratos de glândulas de veneno de *L. intermedia* e *L. laeta*. Zanetti *et al.*, 2002, descrevem a atividade fibrinogenolítica dependente de metaloprotease no veneno de *L. gaucho* e purificaram uma molécula de 30kDa com atividade fibrinogenolítica de aranhas do gênero *Loxosceles*. Young & Pincus (2001), estudando o veneno de *L. rufescens* descrevem metaloproteases com atividades caseinolíticas, gelatinolíticas e fibrinogenolíticas. Duas outras atividades proteolíticas também foram descritas no veneno de *L. intermedia*. Veiga *et al* (2002) identificaram duas serino proteases (85 e 95kDa) e Gasparello (2002) e da Silveira *et al* (2002) identificaram uma amino peptidase básica e prolildipeptidil aminopeptidase.

Astenia: diminuição de forças (ação nervosa ou fadiga)

Glândulas apócrinas: glândulas que perdem parte do citoplasma.

I.15- AÇÃO DO VENENO DO GÊNERO *Loxosceles* NOS VASOS SANGÜÍNEOS

Os vasos sanguíneos de pequeno porte apresentam necrose, arterite e trombose. Pizzi *et al.* (1957) fizeram o primeiro estudo sistemático e detalhado das lesões histológicas produzidas experimentalmente pelo veneno de *Loxosceles laeta*. O estudo das lesões locais, em cobaias e coelhos, demonstrou a existência precoce de intensas alterações vasculares, caracterizadas essencialmente por vasoconstrição inicial das arteríolas e posteriormente, por vasodilatação acentuada. A parede dos vasos sanguíneos da área afetada foi intensamente comprometida, apresentando fenômenos degenerativos e trombóticos. Nas primeiras horas a formação de um intenso edema com extravasamento de células sanguíneas, inclusive eritrócitos. Em estudos realizados em coelhos, com veneno de *L. intermedia*, *L. laeta* e *L. reclusa*, as amostras histopatológicas mostraram após 3 horas, o acúmulo de leucócitos polimorfonucleares ao redor de vênulas e eritrócitos extravasculares sugerindo perda de integridade vascular. Nas arteríolas foi verificado somente edema de células endoteliais. Após 6 horas, havia edema da derme e epiderme, infiltração de leucócitos polimorfonucleares nas paredes das vênulas, vasodilatação, coagulação intravascular, hemorragia volumosa subcutânea, e até mesmo no músculo, necrose, vacuolização das paredes das arteríolas e destruição da integridade das mesmas. Após 48 horas, o infiltrado de leucócitos polimorfonucleares continua crescendo (Smith & Micks, 1970; Futrell *et al.*, 1992; Ospedal *et al.*, 2002). Por outro lado, Pizzi *et al.* (1957)

salientaram ainda, que a intensidade das lesões locais esteve, em geral, em relação inversa

com a severidade das lesões de outros órgãos (rim, pulmão, S.N.C., etc) e com a gravidade do envenenamento. Com isso, inferiram que as importantes alterações vasculares locais, assim como grande intensidade do edema, poderiam ser fatores que impediriam uma rápida ação sistêmica do veneno. Células inflamatórias (especialmente polimorfonucleares) acumuladas no local do envenenamento exercem alguma atividade nesta função (Patel *et al.*, 1994). De acordo com Smith & Micks (1970), a infiltração leucocitária precoce nos vasos sanguíneos no local da picada, implica em injúria dos vasos sanguíneos, sendo considerada como patologia base para a perda da pele.

I.16- TRATAMENTO DA PICADA DE ARANHA-MARROM

O anti-veneno foi desenvolvido por Vellard em 1954 (Barbaro *et al.*, 2005) e passou a ser produzido no Brasil desde 1960 (Furlanetto, 1961) pelo Centro de

Produção de Pesquisas Imunológicas (CPPI), situado em Piraquara, região metropolitana de Curitiba e Instituto Butantan em São Paulo. Diferentes intervenções e medicamentos são propostos para o tratamento de picadas de aranha-marrom e dentre estes pode-se citar: utilização de anti-veneno, analgésicos como aspirina, anti-histamínicos, fentolamina, vasodilatadores, dextran, dapsona, antibióticos, oxigênio hiperbárico, etc. (King 1985; Rees *et al.*, 1985, 1987; Alario *et al.*, 1987; Barrett *et al.*, 1994; Maynor *et al.*, 1997; Masters *et al.*, 1998; Masters, 1998; Isbister *et al.*, 2003; da Silva *et al.*, 2004; Swanson & Vetter, 2005; Futrell, 1992; Phillips *et al.*, 1995; Sams *et al.*, 2001; Wendell, 2003).

Um trabalho publicado por Pauli *et al* em 2006 resultou na obtenção de uma proteína não tóxica, que quando inoculada em animais de laboratório faz com que esses animais produzam grandes quantidades de anticorpos que reconhecem e neutralizam o veneno da aranha-marrom, sendo esta uma inovação que em futuro próximo poderá ser colocada em prática.

A vítima de picada de aranha-marrom deve aumentar a ingestão de líquidos, manter a lesão limpa, evitar exposição ao sol e banhos quentes. O paciente não deve manusear a lesão nem colocar produtos caseiros.

I.17- CONTROLE POPULACIONAL DE *L. intermedia*

Não existe atualmente tecnologia específica para o controle de populações da aranha-marrom em ambiente urbano. A população tem usado certas práticas de controle, como: “repelentes-desalojantes”, armadilha adesivas e repelentes acústicos. Já as empresas de controle de pragas utilizam técnicas e produtos desenvolvidos originalmente para controle de insetos-praga. Os estudos envolvendo a ação de pesticidas sobre a aranha-marrom são raros, e realizados com número muito reduzido de aranhas. Não há outros testes ou propostas de outras práticas de controle, além do controle químico e do controle estrutural (limpeza). Para gerar e acumular conhecimento na área em questão é fundamental um trabalho multidisciplinar tendo como referência conhecimentos aprofundados e específicos sobre a aranha-marrom, procurando pontos no seu ciclo de vida, fisiologia e comportamento que sejam vulneráveis às ações de controle integrado, mantendo os programas coordenados entre si. Devem-se utilizar todas as tecnologias apropriadas e práticas de manejo buscando conseguir o monitoramento e a redução da população das aranhas com conseqüente prevenção de acidentes.

Em relação ao controle químico da aranha-marrom, o uso indiscriminado de inseticidas e outros produtos químicos podem acarretar conseqüências adversas, como por exemplo: a intoxicação de crianças e animais domésticos e o extermínio de alguns predadores naturais.

I.18- PREDADORES NATURAIS

Um dos predadores naturais da aranha-marrom (*Loxosceles sp.*) é a lagartixa (*Hemidactylus mabouia*), hoje em dia dificilmente encontrada nas grandes cidades, **Figura 9**.



Figura 9- Foto da lagartixa (*Hemidactylus mabouia*), potencial predador natural da aranha-marrom.

As lagartixas vêm sendo dizimadas com o avanço urbano, e por desconhecimento, muitas pessoas as matam sem saber que são inofensivas e benéficas à população. Em um trabalho publicado por Ramires *et al.* (2004) é avaliada a atividade deste predador frente a aranha-marrom. Ramires demonstrou que uma lagartixa pode preda mais de 10 aranhas-marrons por noite, devido ao seu elevado metabolismo. Um outro predador natural é a aranha *Scytodes globula* (**Figura 10**), inofensiva aos seres humanos.



Figura 10- Foto da aranha *Scytodes globula*.

Embora seja inofensiva aos seres humanos, é difícil vislumbrar a possibilidade de se utilizar *S. globula* como alternativa a ser empregada no controle populacional da *L. intermedia*, ao contrário da lagartixa, devido à fobia das pessoas por aranhas em geral.

Tendo em vista a alta densidade populacional de *L. intermedia* em ambientes intra-domiciliares, às dificuldades intrínsecas para se controlar a população de qualquer animal no interior das residências e os poucos trabalhos publicados até então envolvendo a identificação de infoquímicos de aranhas, uma das propostas de estudo desta tese foi direcionada para a avaliação da existência e identificação de infoquímicos mediando a comunicação entre indivíduos de *L. intermedia*.

I.19- INFOQUÍMICOS

A comunicação segundo alguns autores, pode ser definida como um processo no qual a informação é trocada entre organismos, com vantagens mutuamente adaptativas (Klopfer & Hatch, 1968). A comunicação pode ainda ser definida como a transmissão de sinais entre dois ou mais organismos, favorecendo a seleção tanto de produção, quanto da recepção do sinal ou sinais (Lewis & Gower, 1980). As substâncias químicas envolvidas na comunicação entre os organismos são denominadas semioquímicos, que significam “sinais químicos” (Nordlund & Lewis, 1976).

O termo semioquímicos é amplo, não se referindo apenas as substâncias químicas responsáveis pelo fornecimento de informações, como também às toxinas. Assim utilizou-se o termo infoquímicos para enfatizar a diferença entre esta categoria de substâncias químicas que transportam informações, toxinas e nutrientes (Dicke, & Sabelis, 1988). O termo infoquímico pode ser definido, então, como uma substância química que em seu contexto natural fornece informações em uma interação entre dois indivíduos, provocando no receptor um comportamento ou uma resposta fisiológica.

A classificação dos infoquímicos baseia-se no tipo de interação, se intraespecífica ou interespecífica, bem como na relação custo/benefício estabelecida entre cada organismo da interação. A Tabela 2, abaixo ilustra como podem ser subdivididos os semioquímicos.

Tabela 2- Representação esquemática dos semioquímicos e suas subclasses

SEMIOQUÍMICOS			
(infoquímicos + toxinas + nutrientes)			
INFOQUÍMICOS			
Ação intraespecífica	Ação interespecífica		
FEROMÔNIOS	ALELOQUÍMICOS		
	ALOMÔNIOS	CAIROMÔNIOS	SINOMÔNIOS
(+ -); (- +); (+ +)	(+ -)	(- +)	(+ +)

Os sinais entre () referem-se ao custo benefício na “comunicação química” entre os insetos emissores e receptores, respectivamente. O sinal **(+)** é benéfico ao emissor ou receptor, ao passo que o sinal **(-)** não contribui significativamente para quem o emite (emissor), ou para quem o recebe (receptor).

I.20- MÉTODOS DE ANÁLISE DE INFOQUÍMICOS EM ARANHAS

Os métodos utilizados para analisar infoquímicos em aranhas são similares àqueles utilizados para insetos. Entretanto, um fator complicador é que as aranhas normalmente precisam ser dispostas individualmente, assim um número elevado de análises pode ser requerido tornando o trabalho bastante cansativo e árduo.

A obtenção das teias a partir de fontes naturais não é indicada para análise, porque a teia absorve muitos compostos naturais presentes no meio ambiente, tais como: voláteis de flores e plantas (Schulz & Toft, dados não publicados).

Os feromônios voláteis são mais difíceis de serem identificados porque o local de produção e liberação não é bem conhecido em aranhas, como o é para insetos. Lavagens com solventes dos corpos das aranhas mostram quantidades de feromônios similares às quantidades de componentes cuticulares (ceras), fato que dificulta a análise. É importante confinar as aranhas em recipientes grandes o bastante para permitirem que exibam comportamentos normais. Devido às pequenas quantidades de amostra que são obtidas, a técnica via cromatografia gasosa acoplada à espectroscopia de massas (CG-EM) é o método de escolha para a análise dos extratos nos quais estão presentes feromônios voláteis.

As análises dos lipídeos menos voláteis e de componentes polares do feromônio podem requerer a derivatização da amostra que tem por finalidade melhorar as características cromatográficas, fornecendo assim mais informações sobre as estruturas dos compostos presentes. É provável que as técnicas cromatográficas com elevado poder de separação e alta sensibilidade para compostos polares, tais como a eletroforese capilar acoplada a espectrometria de massas, possa ser mais empregada em trabalhos futuros.

I.21- ALELOQUÍMICOS EM ARANHAS

I.21.1- ALOMÔNIOS

Um dos exemplos mais fascinantes do emprego de infoquímicos por aranhas é a mimetização de feromônios de lepidópteros pelas aranhas bolas (Araneidae), fato primeiramente observado por Hutchinson (1903). A biologia destas aranhas foi revista em detalhes por Yeargan (1994). Normalmente, as aranhas bolas (Mastophoreae) não constroem teias como qualquer outra aranha, mas produzem uma “linha suspensa” curta com uma gota (bola) de cola na extremidade. Quando um macho de uma espécie de lepidóptero *Tetanolita myenesalis* é atraído pelo alomônio que emana da aranha e se aproxima desta, ela lança rapidamente bolas pegajosas na caça. Se a presa for capturada, fato que ocorre raramente, a cola prende a vítima, de modo que possa ser picada pela aranha. O fato de somente o macho da espécie ser atraído desencadeou a hipótese de que os alomônios podem estar relacionados aos feromônios sexuais desta espécie (Eberhard, 1977). Estudos realizados por Stowe *et al.*, (1987) colaboraram para esta hipótese, identificando os componentes do feromônio sexual do lepidóptero como sendo um mistura de (Z)-9-tetradecenal **(1)**, acetato de (Z)-9-tetradecenila **(2)**, (Z)-11-hexadecenal **(3)**, e possivelmente o acetato de (Z)-11-hexadecenila **(4)**, voláteis coletados da fêmea de *Mastophora cornigera* **(Figura 11)**. Tais compostos eram também produzidos pelas aranhas bolas *M. cornigera* e *M. hutchinsoni* para capturarem suas presas.

Mimetização: ato de tomar os hábitos de uma espécie (produzir seus feromônios)

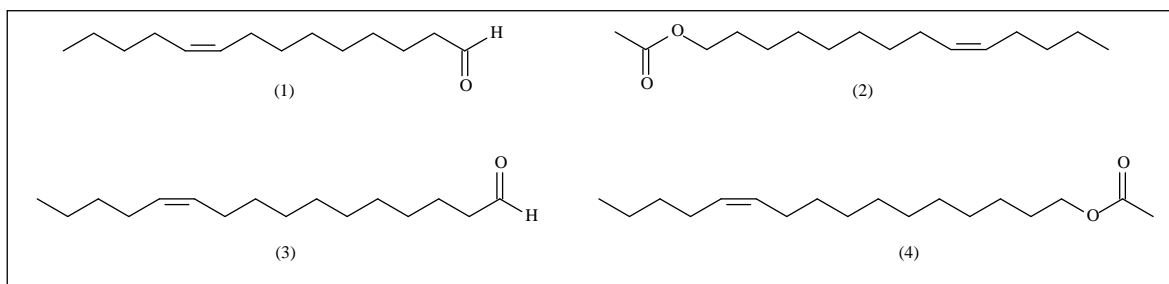


Figura 11- Compostos identificados como sendo componentes do feromônio sexual do lepidóptero *Tetanolita myenesalis*, também produzidos por duas espécies de aranhas predadoras *M. cornigera* e *M. hutchinsoni*.

Ainda mais extraordinário foi o fato de os autores apresentarem evidências de que a mistura atrativa produzida pode variar com o tempo e entre indivíduos, sugerindo que as aranhas têm algum grau de controle sobre a composição da mistura empregada para atrair as presas. Isto explicaria porque 19 espécies diferentes deste lepidóptero são capturadas mesmo quando os compostos que atraem uma espécie são conhecidos por inibir uma segunda. Por exemplo, a mariposa *Peridroma saucia* é atraída pela mistura de **(2)** e **(4)**, mas a atração é inibida por **(3)**.

A situação pode ser menos complicada para outras aranhas bolas que atraem menos espécies de presas. Por exemplo *M. hutchinsoni* se alimenta de quatro espécies de lepidópteros, das quais *Lacinipolia renigera* e *Tetanolita myenesalis* são as mais capturadas (Yeargan, 1994). A composição do feromônio sexual de *L. renigera* foi determinada na proporção de 100:4 de uma mistura composta por acetato de (*Z*)-9-tetradecenila **(2)** e acetato de (9*Z*, 12*E*)-9,12-

tetradecadienila **(5)** **Figura 12**, sendo que ambos os componentes são importantes na atração.

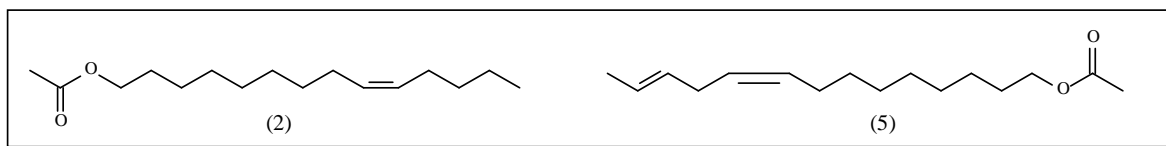


Figura 12- Compostos constituintes do feromônio sexual de *L. renigera*.

Análise dos voláteis liberados pelas aranhas no campo confirmaram a presença dos compostos em proporção similar à produzida pelas fêmeas da mariposa em questão (Gemeno *et al.*, 2000).

Deve-se salientar que a análise e identificação de alomônios nas aranhas bolas é extremamente difícil, porque são produzidos em pequenas quantidades (1-2 ng/teia (Stowe *et al.*, 1987)). Coleta dos voláteis deve ser efetuada empregando-se apenas uma aranha por vez, pois elas são caçadoras solitárias.

Uma outra utilização interessante dos infoquímicos para a atração da caça foi observada nas aranhas sociais da espécie *Mallos gregalis* (Dyctinidae). Estas aranhas se alimentam de moscas que consomem carne em decomposição. Quando uma destas moscas é capturada nas teias destas aranhas, elas propositalmente, deixam restos de suas presas em suas teias. A decomposição deste material atrai outras moscas que são capturadas. Alguns microorganismos crescem muito bem nas carcaças de moscas previamente capturadas por estas aranhas e que os restos de sua refeição são presos na teia, onde fermentam e crescem. Os odores produzidos pela fermentação atraem mais moscas para teia.

Interessante, é o fato que os fermentos não crescem em moscas inoperantes normais ou nas moscas comidas por outras aranhas, indicando um relacionamento mutualista entre as aranhas e o fermento (Tietjen, *et al.*, 1987).

I.21.2- CAIROMÔNIOS

Existem diversos exemplos documentados sobre aranhas que exploram cairomônios. Em alguns deles a espécie predadora usa tais compostos para localizar sua presa, em outros, a presa os utiliza para fugir de seu predador. A aranha *Hogna helluo* localiza sua presa, fêmeas de uma outra aranha, *Pardosa milvina*, através de seus voláteis os quais, provavelmente, estariam relacionados com seu feromônio sexual (Searcy *et al.*, 1999). Por outro lado, para dificultar sua detecção, *P. milvina* responde aos estímulos químicos de seu predador reduzindo seus movimentos. Ainda mais intrigante é o fato da dieta do predador ter efeito sobre este mecanismo de comunicação entre presa-predador, ou seja, *H. helluo* alimentadas exclusivamente de *P. milvina*, induzem maior inibição de movimentos em *P. milvina* do que quando alimentadas com grilos domésticos *Acheta domesticus* (Persons *et al.*, 2001). Curiosamente *H. helluo* não responde aos voláteis do grilo doméstico *A. domesticus* (Persons & Rypstra, 2000).

A aranha *Habronestes bradleyi* (Zoodariidae) é um predador especialista da formiga *Iridomyrmex purpureus*. Estas formigas são extremamente agressivas com intrusos, e possuem um feromônio de alarme o 6-metil-5-hepten-2-ona, ou sulcatona (6), **Figura 13**.

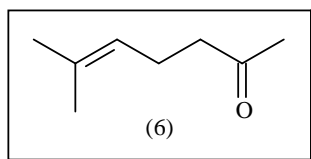


Figura 13- Cairomônio usado pela aranha *Habronestes bradleyi* (Zoodariidae).

Este feromônio de alarme que é liberado pelas formigas quando feridas é usado como um cairomônio pela aranha para localizar sua presa. O cairomônio é detectado pelos receptores localizados no primeiro par de pernas da aranha (Allan *et al.*, 1996).

Cairomônios são também empregados por outras famílias de aranhas. *Habrocestum pulex* (Salticidae) é também atraída pelo feromônio de alarme (5) (Clark *et al.*, 2000). Esta espécie é capaz de reconhecer solos sobre os quais formigas andaram recentemente, o que é demonstrado pelo aumento da atividade como andar agitado e saltitante e elevação do corpo.

Uma outra interação mediada por cairomônios é a detecção da presença de predadores através de seus sinais químicos. Este tipo de comunicação foi verificada na interação da aranha *Argyrodes trigonum* (Theridiidae), uma espécie cleptoparasítica que vive na teia e que ocasionalmente se alimenta de sua anfitriã a *Frontinella communis*. Ao entrar em contato com os compostos cuticulares de *A. trigonum*, a *F. communis* responde recuando e se retirando, em contraste com o comportamento de ataque que é elicitado quando em contato com compostos cuticulares de suas presas (Suter *et al.*, 1989).

Compostos químicos de aranhas são também utilizados por predadores não aracnídeos para localizá-las. Por exemplo, a vespa *Gelis festinans* parasita a aranha *Erigone atra*, comumente encontrada em plantações do trigo. O contato

com a teia de sua presa elícita o comportamento de procura da vespa, ao passo que o contato com a teia de outra espécie de aranha não elícita resposta alguma, indicando um grau elevado de especificidade (Baarlen, *et al.*, 1996). Os autores sugeriram que os lipídeos presentes nas teias estariam mediando esta comunicação, o que não foi demonstrado.

I.22- FEROMÔNIOS EM ARANHAS

O isolamento e identificação de feromônios de aranhas têm recebido pouca atenção dos pesquisadores. Isto se deve em parte pelos movimentos mais restritos destes animais quando comparados aos movimentos exibidos pelos insetos voadores o que dificulta observações que indiquem a comunicação mediada por feromônios. Além disto, poucas aranhas são consideradas pragas quando comparadas aos insetos. No entanto, a necessidade de encontrar parceiros para copularem se faz presente tanto para insetos como aranhas e isto não pode ser um evento controlado apenas pela probabilidade, pelo acaso. Os insetos, que têm a capacidade de voar, são melhores equipados para responderem a sinais químicos na procura por seus parceiros, ao passo que as aranhas, ao andarem pela vegetação, encontram maiores dificuldades para seguirem qualquer trilha química através da complexa arquitetura das plantas (Schulz, 2004).

Um dos primeiros relatos de feromônio mediando a comunicação de uma espécie de aranha foi o trabalho de Lendl (1887/88), que descreveu que um “volátil” liberado pela fêmea de *Geolycosa vultuosa* (*Trochosa infernalis*)

(Lycosidae) atraía machos. Bristowe & Locket (1926) mostraram que machos de Lycosid exibiram padrões motores relacionados ao cortejo quando em contato com estímulos químicos das fêmeas, na ausência destas. Em trabalho posterior Kaston (1936) demonstrou que apêndices retirados das fêmeas desencadearam a exibição de cortejo nos machos e que a atividade era perdida após extração com éter etílico. Observações correlatas a estas foram também registradas para outras espécies por vários autores (Leborne, 1981; Tiejn & Rovner, 1982; Pollard, *et al.*, 1987 e Stewart, 1988).

A produção de teia é comum a todas as aranhas e tem sido considerada como uma extensão de seus sistemas sensoriais (Witt, 1975). Muitos dos estudos listados na **Tabela 3**, referem-se a feromônios de contato presentes nas teias, principalmente de espécies pertencentes às famílias Lycosidae e Salticidae, as mais estudadas. Apesar das evidências, os trabalhos publicados não provam de forma incontestada a presença destes feromônios, isto porque o próprio contato com a teia pode indicar se esta pertence a um indivíduo da mesma espécie por fatores como forma e estrutura física. Exemplo disto é evidenciado pelo fato de 50% dos machos de *Cupiennius salei* reagirem exibindo comportamento de cortejo a teias de indivíduos da mesma espécie que não contém o feromônio (Tichy *et al.*, 2001). A arquitetura de uma teia pode também fornecer outras informações como o tamanho do indivíduo que a construiu, como foi demonstrado em trabalho com a aranha *Nephilengys cruentata* (Tetragnathidae) (Schuck-Paim, 2000).

Para excluir a possibilidade de respostas a estímulos táteis trabalhos foram realizados fazendo a extração das teias com solventes de diferentes polaridades e retestando as teias em ensaios comportamentais (trabalhos marcados com a letra

W na **Tabela 3**). Tal procedimento fornece indicações do uso de feromônios, mas não podem ser considerados conclusivos, uma vez que os ensaios comportamentais com os extratos preparados não foram realizados, principalmente nos trabalhos menos recentes. A submissão das teias à extração com solventes pode alterar suas propriedades físicas, como demonstrado por Shao & Vollrath (1999). Neste trabalho os autores mostraram que solventes de alta polaridade, como água ou 1-butanol, têm maior capacidade de alterar as propriedades físicas das teias de várias espécies de aranhas, provavelmente pela quebra das ligações de hidrogênio verificadas entre as subunidades das proteínas que compõe as teias.

A extração das teias com solventes apolares também pode remover compostos de origem lipídica presentes nas mesmas, e, como conseqüência, alterar a maneira como outras aranhas da mesma espécie vão “sentir” esta teia (Schulz, 1999). Este processo de extração pode eliminar a resposta à teia, mesmo quando não há a utilização de infoquímicos neste contexto. As aranhas também podem detectar outras propriedades físicas das teias como a elasticidade ou a tensão elástica das fibras como mostrado por Tietjen (1977) e Tietjen & Rovner (1980) para *Rabidosa rabida* (Lycosidae). A chuva ou o orvalho podem também alterar as propriedades das teias, fornecendo informações a respeito da idade destas. Assim sendo, a extração com solventes certamente pode causar alterações nas teias desativando-as, mesmo quando não existem feromônios depositados nas mesmas. Isto explica o fato de teias ativas perderem sua atividade após serem extraídas, resultando também em extratos inativos. Desta forma, estudos comportamentais com os extratos obtidos são fundamentais para

provar a existência de feromônios mediando algum tipo de comunicação entre as aranhas e suas teias.

Desde as primeiras tentativas de identificação de feromônios de aranhas efetuadas por Ayyagari & Tietjen (1986) que isolaram parcialmente um feromônio que mediava interações agonísticas entre machos de *Schizocosa ocreata*, vários trabalhos evidenciaram a presença de feromônios, principalmente nas teias das aranhas e estão resumidos na **Tabela 3**, a seguir.

Tabela 3- Publicações relacionadas a feromônios de aranhas.

Família / espécies	Tipo de estudo	Comentários	Referências
2 Atypidae			
<i>Sphodros abboti</i>	O	Provável feromônio sexual de contato, presente na teia.	Coyle & Shear (1981)
5 Hexathelidae			
<i>Atrax infensus</i>	V	Machos são atraídos por fêmeas escondidas.	Hickman (1964)
34 Dysderidae			
<i>Dysdera crocata</i>	W	Feromônio sexual de contato.	Pollard et al. (1987)
47 Erisidae			
<i>Stegodyphus sarasinorum</i>	O,S	Espécie social; reconhecimento coespecífico de indivíduos por sinais químicos.	Kullmann (1972); Roland (1984)
55 Theridiidae			
<i>Latrodectus hesperus</i>	S	A teia de ambos os sexos muda o comportamento no sexo oposto.	Ross & Smith (1979)
<i>Latrodectus mactans</i>	S	A teia de fêmea do <i>L. hesperus</i> induz o cortejo em machos.	Ross & Smith (1979)
<i>Latrodectus revivensis</i>	S	A teia de ambos os sexos muda o comportamento no sexo oposto.	Anava & Lubin (1993)
<i>Steatoda</i> (as	W	A teia da fêmea induz o comportamento de cortejo	Gwinner-Hanke (1970)

<i>Teutana) grossa</i>		nos machos coespecíficos.	
61 Linyphiidae			
<i>Frontinella communis</i> (as <i>pyramitela</i>)	W	Os machos respondem com mudanças de comportamento a teia das fêmeas.	Suter & Renkes (1982); Suter & Hirscheimer (1986)
	S,W	O macho determina o sexo do indivíduo coespecífico por sinais químicos cuticulares.	Suter et al. (1987)
<i>Linyphia tenuipalpis</i>	I: 10, 11	Feromônio sexual liberado pelas fêmeas fazem machos reduzirem tamanho das teias.	Schulz & Toft (1993b)
<i>Linyphia triangularis</i>	I: 10, 11	Feromônio sexual liberado pelas fêmeas fazem machos reduzirem tamanho das teias.	Schulz & Toft (1993b)
<i>Neriere emphana</i>	P	Compostos (10) e (11) presentes na teia.	Schulz & Toft, resultados não publicados.
<i>Neriere</i> (as <i>Linyphia</i>) <i>litigosa</i>		Presença de feromônio sexual volátil na fêmea.	Watson (1986)
	P	Compostos (10) e (11) presentes na teia.	Schulz & Watson, resultados não publicados.
<i>Neriere montana</i>	P	Compostos (10) e (11) presentes na teia.	Schulz & Toft, resultados não publicados.
<i>Neriere peltata</i>	P	Compostos (10) e (11) presentes na teia.	Schulz & Toft, resultados não publicados.
<i>Microlinyphia impigra</i>	P	Compostos (10) e (11) presentes na teia.	Schulz & Toft, resultados não publicados.
62 Tetragnathidae			
<i>Metellina segmentata</i>	O	Comportamento de macho aguardando fêmea para cópula, estimulado pela liberação do feromônio da fêmea na teia.	Prenter et al. (1994)
<i>Nephila clavata</i>	E,V	Os machos respondem ao feromônio das fêmeas que recentemente atingiram o estagio adulto.	Miyashita & Hayashi (1996)
63 Araneidae			
<i>Araneus trifolium</i>	V	As fêmeas emitem feromônio sexual volátil.	Olive (1982)
<i>Argiope aurantia</i>	V	Fêmeas são atraídas às teias de <i>A. trifolium</i> .	Enders (1975); Olive (1982)
<i>Argiope trifolium</i>	O	As fêmeas emitem feromônio sexual volátil.	Olive (1982)
<i>Cyrtophora cicatrosa</i>	V	As fêmeas emitem feromônio sexual volátil.	Blanke (1973); Blanke (1975)

64 Lycosidae

<i>Alopecosa</i> (as <i>Tarentula</i>) <i>barbipes</i>	O	Machos são estimulados pelo feromônio de contato da fêmea.	Bristowe & Locket (1926)
<i>Geolycosa vultuosa</i> (as <i>Trochosa</i> <i>infernalis</i>)	O	Ambos os sexos atraídos pelos voláteis da fêmea.	Lendl (1887/88)
<i>Hogna</i> (as <i>Lycosa</i>) <i>carolinensis</i>	O	A teia da fêmea induz o comportamento de cortejo nos machos.	Farley & Shear (1973)
<i>Hogna</i> (as <i>Lycosa</i>) <i>helluo</i>	O	Compostos presentes na cutícula das fêmeas induzem o comportamento de cortejo nos machos.	Kaston (1936)
<i>Hogna</i> (as <i>Lycosa</i>) <i>longitarsis</i>	W	Machos seguem o fio guia das fêmeas e demonstram comportamento de cortejo.	Lizotte & Rovner (1989)
<i>Lycosa</i> (as <i>Trochosa</i>) <i>singoriensis</i>	O	Voláteis da fêmea são detectáveis e atraem machos.	Kolosvary (1932)
<i>Pardosa amentata</i>	S	Machos seguem o fio guia das fêmeas e demonstram comportamento de cortejo.	Richter et al. (1971) ; Dijkstra (1976)
<i>Pardosa hortensis</i>	S	Compostos presentes na cutícula das fêmeas induzem o comportamento de cortejo nos machos.	Robert & Krafft (1981)
<i>Pardosa lapidicina</i>	W	Machos seguem o fio guia das fêmeas e demonstram comportamento de cortejo.	Dondale & Hegdekar (1973)
<i>Pardosa milvina</i>	E	Compostos presentes na cutícula das fêmeas induzem o comportamento de cortejo nos machos.	Kaston (1936)
	V	A fêmea possui feromônio sexual volátil.	Searcy et al. (1999)
<i>Pardosa modica</i>	W	Compostos presentes na cutícula das fêmeas induzem o comportamento de cortejo nos machos.	Kaston (1936)
<i>Pardosa moesta</i>	W	Machos seguem o fio guia das fêmeas e demonstram comportamento de cortejo.	Hegdekar & Dondale (1969)
<i>Pardosa ramulosa</i>	O	Machos seguem o fio guia das fêmeas e demonstram comportamento de cortejo.	Sarinana et al. (1971)
<i>Pardosa saxatilis</i>	W	Machos seguem o fio guia das fêmeas e demonstram comportamento de cortejo.	Kaston (1936) ; Hegdekar & Dondale (1969)
<i>Pardosa xerampelina</i>	S	A teia da fêmea induz o comportamento de cortejo nos machos.	Dumais et al. (1973)
<i>Rabidosa</i> (as <i>Lycosa</i>) <i>puntulata</i>	O	Os machos seguem os fios guia das fêmeas.	Tietjen (1977) ; Tietjen & Rovner (1980)

<i>Rabidosa</i> (as <i>Lycosa</i>) <i>rabida</i>	O,S	Machos seguem o fio guia das fêmeas e demonstram comportamento de cortejo. Machos seguem o fio guia das fêmeas e demonstram comportamento de cortejo.	Kaston (1936) ; Rovner (1968) ; Tietjen (1977) ; Tietjen & Rovner (1980) ; Tietjen (1979a)
<i>Schizocosa avida</i>	W	Machos seguem o fio guia das fêmeas e demonstram comportamento de cortejo.	Hegdekar & Dondale (1969)
<i>Schizocosa crassipalpa</i> (as <i>crassipalpis</i>)	W	Machos seguem o fio guia das fêmeas e demonstram comportamento de cortejo.	Hegdekar & Dondale (1969)
<i>Schizocosa crassipes</i>	W	Machos seguem o fio guia das fêmeas e demonstram comportamento de cortejo ao contato com a cutícula.	Kaston (1936)
<i>Schizocosa ocreata</i>	V	Os machos respondem às fêmeas escondidas.	Tietjen (1979b)
	E	Os machos respondem aos extratos da teia masculina.	Ayyagari & Tietjen (1986)
	O	Os machos respondem com cortejo à seda de fêmeas.	Ayyagari & Tietjen (1986)
<i>Schizocosa saltatrix</i>	V	Os machos respondem às fêmeas escondidas.	Tietjen (1979b)
<i>Schizocosa</i> (as <i>Lycosa</i>) <i>tristani</i>	W	Machos seguem o fio guia das fêmeas e demonstram comportamento de cortejo.	Lizotte & Rovner (1989)
66 Pisauridae			
<i>Dolomedes scriptus</i>	E	Cortejo pelos machos elicitados por compostos das fêmeas solúveis em éter.	Kaston (1936)
<i>Dolomedes triton</i>	S,E	Machos seguem o fio guia da teia e demonstram mudanças no comportamento após o contato com extratos. Os machos respondem a extrato aquoso das aranhas ou teias.	Roland & Rovner (1983)
74 Ctenidae			
<i>Cupiennius coccineus</i>	P	Composto (9) presente na teia da fêmea.	Papke, Schulz & Tichy, resultados não publicados.
	S	A teia coespecífica induz cortejo	Barth & Schmitt (1991)
<i>Cupiennius getazi</i>	P	Presença do composto (9) presente na teia da fêmea.	Papke, Schulz & Tichy, resultados não publicados.
	S	A teia coespecífica induz cortejo	Barth & Schmitt (1991)

<i>Cupiennius salei</i>	I: 9	O feromônio presente na teia da fêmea induz cortejo em machos.	Tichy et al. (2001) ; Papke et al. (2000) ; Rovner & Barth (1981)
75 Agelenidae			
<i>Agelopsis aperta</i>	I: 11	O feromônio volátil sexual da fêmea atrai machos e induz cortejo.	Riechert & Singer (1995) ; Papke et al. (2001)
<i>Agelena consociata</i>	S	Aranha social; teia ativa a co-específicos.	Krafft (1970) ; Krafft (1971)
	E	Feromônio cuticular para o reconhecimento coespecífico.	Krafft (1974)
<i>Tegenaria atrica</i>	E	A teia e a cutícula de fêmeas elicitam o comportamento de cortejo nos machos.	Prouvost et al. (1999)
	O	Hidrocarbonetos mediam possivelmente interações agonísticas intraespecíficas.	Trabalon et al. (1996)
<i>Tegenaria domestica</i>	S	Orientação do macho para localizar a teia da fêmea.	Roland (1984)
	E	Cortejo do macho induzido pelo extrato cuticular da fêmea.	Trabalon et al. (1997)
<i>Tegenaria pagana</i>	S	Orientação de machos para a teia das fêmeas.	Roland (1984)
	E	Cortejo do macho induzido pelo extrato cuticular da fêmea.	Trabalon et al. (1997)
<i>Tegenaria parietina</i>	S	Cortejo de machos em teias vazias de fêmeas.	Krafft (1978)
82 Dictynidae			
<i>Dictynia calcarata</i>	O	A teia das fêmeas induz comportamento de cortejo nos machos.	Jackson (1978)
83 Amaurobiidae			
<i>Amaurobius fenestralis</i>	S	Cortejo de machos em teias vazias de fêmeas.	Krafft (1978)
<i>Amaurobius similis</i>	S	Cortejo de machos em teias vazias de fêmeas.	Krafft (1978)
<i>Coelotes terrestris</i>	S	Cortejo de machos em teias vazias de fêmeas.	Krafft (1978) ; Roland (1984)
<i>Mallos trivittatus</i> (as <i>trivittatus</i>)	S	Cortejo de machos em teias vazias de fêmeas.	Jackson (1978)
<i>Mallos gregalis</i>	W	A teia atrai o coespecífico.	Jackson (1982)
91 Clubionidae			
<i>Clubiona cambridgei</i>	W	Feromônio sexual de contato.	Pollard et al. (1987)
106 Philodromidae			

<i>Tibellus oblongus</i>	S	As pernas das fêmeas são atraentes aos machos, os compostos são solúveis em éter.	Kaston (1936)
107 Thomisidae			
<i>Diaea socialis</i>	E	Aranha social; o feromônio volátil presente na teia atrai coespecíficos.	Evans & Main (1993)
108 Salticidae			
<i>Anasaitis</i> (as <i>Corythalia</i>) <i>canosa</i>	S	A teia da fêmea muda o comportamento dos machos, voláteis prolongam o cortejo.	Jackson (1987); Pollard et al. (1987)
<i>Bavia aericeps</i>	S	A teia da fêmea muda o comportamento dos machos.	Jackson (1987)
<i>Brettus cingulatus</i>	V	Os machos encontram as fêmeas por feromônios voláteis.	Pollard et al. (1987)
<i>Carrholtus xanthogrammus</i>	S	A teia da fêmea é usada na sua localização por machos.	Yoshida & Suzuki (1981)
<i>Corythalia xanthopa</i>	O	Os machos cortejam fêmeas recentemente mortas sem contato.	Crane (1949)
<i>Cosmophasis micarioides</i>	S	A teia de fêmeas muda o comportamento dos machos.	Jackson (1987)
<i>Cyrba algerina</i>	O	O feromônio volátil das fêmeas promove o cortejo nos machos.	Pollard et al. (1987)
<i>Euophrys parvula</i>	S	A teia das fêmeas muda o comportamento dos machos.	Jackson (1987)
<i>Euryattus</i> sp.	S	A teia das fêmeas muda o comportamento dos machos.	Jackson (1987)
<i>Helpis minitabunda</i>	S	A teia das fêmeas muda o comportamento dos machos.	Jackson (1987)
<i>Jacksonoides</i> (as <i>Lagnus</i>) <i>kochicanosa</i>	S	A teia das fêmeas muda o comportamento dos machos.	Jackson (1987)
<i>Lyssomanes viridis</i>	O	O feromônio volátil das fêmeas induz o cortejo nos machos.	Pollard et al. (1987)
<i>Marpissa marina</i>	S	A teia das fêmeas muda o comportamento dos machos.	Jackson (1987)
<i>Menemerus</i> sp.	S	A teia das fêmeas muda o comportamento dos machos.	Jackson (1987)
<i>Mopsus mormon</i>	S	A teia das fêmeas muda o comportamento dos	Jackson (1987)

		machos.	
<i>Myrmarachne lupata</i>	S	A teia das fêmeas muda o comportamento dos machos.	Jackson (1987)
<i>Natta horizontalis</i> (as <i>Cyllobelus rufopictus</i>)	S	A teia das fêmeas muda o comportamento dos machos.	Jackson (1987)
<i>Phidippus audax</i>	W	A teia das fêmeas muda o comportamento dos machos.	Pollard et al. (1987)
<i>Phidippus johnsoni</i>	S	A teia das fêmeas induz o cortejo nos machos.	Jackson (1986); Jackson (1987)
	W	A teia das fêmeas induz o cortejo nos machos.	Pollard et al. (1987)
<i>Phidippus octopunctatus</i> (as <i>opifex</i>)	S	A teia das fêmeas muda o comportamento dos machos.	Jackson (1987)
<i>Phidippus pulcher</i> (as <i>otiosus</i>)	S	A teia das fêmeas muda o comportamento dos machos.	Jackson (1987)
<i>Phidippus regius</i>	S	A teia das fêmeas muda o comportamento dos machos.	Jackson (1987)
<i>Phidippus whitmani</i>	S	A teia das fêmeas muda o comportamento dos machos.	Jackson (1987)
<i>Plexippus paykulli</i>	S	A teia das fêmeas muda o comportamento dos machos.	Jackson (1987)
<i>Portia africana</i>	V	Os voláteis das fêmeas mudam o comportamento dos machos coespecíficos.	Willey & Jackson (1993)
<i>Portia fimbriata</i>	S	A teia das fêmeas muda o comportamento dos machos.	Jackson (1987); Clark & Jackson (1995b)
	V	Os voláteis das fêmeas mudam o comportamento dos machos coespecíficos.	Willey & Jackson (1993)
<i>Portia labiata</i>	S	A teia das fêmeas muda o comportamento dos machos.	Jackson (1987); Clark & Jackson (1995b)
	V	Os voláteis das fêmeas mudam o comportamento dos machos coespecíficos.	Willey & Jackson (1993)
<i>Portia schultzi</i>	S	A teia das fêmeas muda o comportamento dos machos.	Jackson (1987)
	V	Os voláteis das fêmeas mudam o comportamento dos machos coespecíficos.	Willey & Jackson (1993)

<i>Pseudicius</i> sp.	S	A teia das fêmeas muda o comportamento dos machos.	Jackson (1987)
<i>Simaetha paetula</i>	S	A teia das fêmeas muda o comportamento dos machos.	Jackson (1987)
<i>Simaetha thoracica</i>	S	A teia das fêmeas muda o comportamento dos machos.	Jackson (1987)
<i>Thiodina sylvana</i>	S	A teia das fêmeas muda o comportamento dos machos.	Jackson (1987)
<i>Trite auricoma</i>	S	A teia das fêmeas muda o comportamento dos machos	Jackson (1987)
<i>Trite planiceps</i>	S	Os machos respondem seletivamente à teia de fêmeas.	Jackson (1987); Taylor (1998)

Fonte: Schulz, *et al.*, 2004.

Legendas: **E:** teste comportamental com extratos; **S:** teste comportamental com teia, substrato ou corpos; **O:** observações comportamentais; **I:** identificação do feromônio com teste comportamental; **W:** testes comportamentais com teia ou extratos obtidos pela lavagem dos corpos; **A:** confirmação da presença do feromônio e ou componentes relacionadas à espécie; **V:** teste comportamental para o feromônio volátil.

I.22.1- FEROMÔNIOS DE ARANHAS IDENTIFICADOS

Apenas três feromônios de aranhas tiveram suas estruturas identificadas até então (Schulz, 2004). Com relação a feromônios de aranhas do gênero *Loxosceles* nada está descrito até o momento.

I.22.1.1- Linyphiidae

O feromônio é liberado na teia por fêmeas de *Linyphia triangularis* tendo sido o primeiro feromônio de aranha identificado (Schulz & Toft, 1993b). Estes infoquímicos provocam no macho a reação de reduzir as teias das fêmeas cortando-as e enrolando-as. Este fenômeno foi primeiramente observado por van Helsdingen (1965) para a espécie *L. litigosa*. Watson (1986) demonstrou que a redução da teia das fêmeas reduz a liberação do feromônio, através da redução da superfície de contato. Este comportamento é particularmente observado em populações menos densas onde os machos procuram pelas fêmeas. Em regiões onde a população é mais densa o macho ocupa a teia da fêmea imatura aguardando sua maturação sexual (Toft, 1989). Este comportamento de redução das teias pode ser induzido pelo extrato das teias de fêmeas virgens, ou seja, a atividade pode ser transferida para teias inativas, àquelas pertencentes às jovens ou às fêmeas não virgens, pela pulverização destas com o extrato das teias de fêmeas virgens.

Os compostos ativos foram identificados empregando-se a técnica de CG-EM, derivatizações dos extratos, cromatografia em coluna quiral e síntese

estereosseletiva do produto natural (Schulz & Toft, 1993b). Dois compostos apresentaram atividade, o ácido (*R*)-3-hidroxibutírico (**7**) e o ácido (3*R*,3'*R'*)-3-butírico(3-hidroxibutirilóxi) (**8**), **Figura 14**.

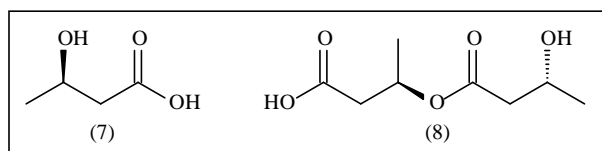


Figura 14- Ácido (*R*)-3-hidroxibutírico (**7**), e o ácido (3*R*,3'*R'*)-3-butírico(3-hidroxibutirilóxi) (**8**), feromônios liberados na teia de *L. triangularis*.

Bioensaios comprovaram a atividade promovida pelo composto (**8**), e também pelo monômero (**7**). O feromônio (**8**) ocorre nas quantidades de até 5 µg/teia sendo que o composto (**7**) em quantidades menores (concentrações entre 0,03 e 0,05 µg/teia). Quantidades traços do ácido crotonico (**9**), e do composto (**10**) também foram detectadas, **Figura 15**.

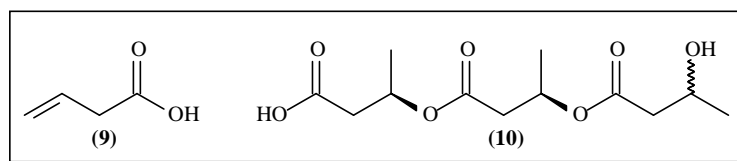


Figura 15- Compostos detectados em quantidades traços nas teias de *L. triangularis*.

Os compostos **(7)** e **(9)** atraíram machos (Toft & Schulz, resultados não publicados) e, provavelmente, atuam como feromônios voláteis como sugerido por Watson (1986). O sistema de comunicação química parece ser altamente sofisticado à medida que as fêmeas produzem o dímero **(8)** e o depositam nas teias, o qual estimula nos machos o comportamento de reduzi-las. Este mesmo composto provavelmente se decompõe em **(7)** e **(9)** que seriam os voláteis responsáveis pela atração dos machos até as teias.

I.22.1.2- Agnelidae

A fêmea da aranha do deserto *Agnelopsis aperta* libera um feromônio volátil que atrai machos coespecíficos (Riechert & Singer, 1995). Este feromônio foi identificado como 8-metil-2-nonanona **(11)** (**Figura 16**), um semioquímico até então desconhecido entre artrópodes. O feromônio em questão foi isolado tanto por aeração de fêmeas quanto por lavagens de seus abdômens, duas semanas após terem atingido o estágio adulto, período que se tornam sexualmente receptivas. O feromônio atraiu machos em uma arena de três escolhas em doses de 500 ng (Papke, *et al.*, 2001). Uma outra cetona produzida apenas pelas fêmeas, 6-metil-3-heptanona **(12)** (**Figura 16**), não se mostrou ativa. Doses muito baixa do composto **(11)** (10^{-9} mg/mL) aplicado a um papel de filtro colocado em teias de fêmeas jovens vazias induziram também o comportamento de cortejo nos machos (Papke *et al.*, 2001). O valor da dose ED₅₀ (ED: dose eficaz) do composto

(11) é de aproximadamente $5,5 \times 10^{-4}$ mg/mL de hexano. Em contraste, a cetona (12) induz somente uma resposta a machos imaturos em concentrações mais elevadas que as naturais (100 mg/mL). As experiências com uma mistura de ambos os compostos não mostraram nenhum efeito sinérgico promovido pelo composto (12) (Papke *et al.*, 2001).

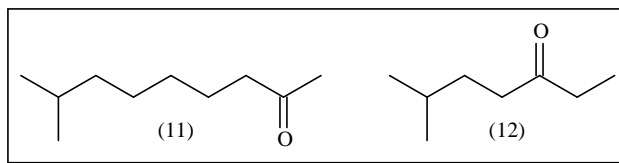


Figura 16- Cetonas identificadas através da lavagem de fêmeas de *A. aperta*.

I.22.1.3- Ctenidae

A aranha *Cupiennius salei* (Ctenidae) deposita em sua teia um feromônio que provoca um estímulo vibracional nos machos, a que a fêmea receptiva responde (Papke *et al.*, 2000; Tichy *et al.*, 2001). Os sinais vibracionais são utilizados pelas fêmeas para guiar os machos (Rovner & Barth, 1981; Barth & Schmitt, 1991). As teias dos machos ou das fêmeas jovens não elicitaram nenhuma resposta. Análises dos extratos das teias via CG-EM não levou à identificação dos compostos, mesmo após várias reações de derivatização. A estrutura do feromônio foi identificada a partir da análise via espectrometria de ressonância magnética nuclear de hidrogênio dos extratos metanólicos de 10 mg de amostra de teias extraídas a partir das glândulas produtoras com a ajuda de choque elétrico dirigido. Pela comparação com amostras sintéticas, derivatização,

e cromatografia gasosa em fase quiral (ciclodextrina), o feromônio foi identificado como uma mistura de 95:5 (*S/R*) dos enantiômeros do 1,1-citrato de dimetila (**13**) (cupilure, **Figura 17**). Somente o enantiômero (*S*) apresentou atividade, (Tichy *et al.*, 2001).

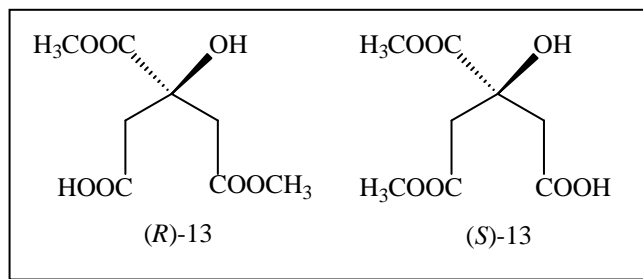


Figura 17- Feromônio de *C. salei*, (*S*)-1,1'-citrato de dimetila ou ácido (*S*)-3,4-di(metoxicarbonil)-3-hidroxibutanóico).

O cupilure foi também detectado na teia das espécies *C.getazi* e *C. coccineus* (Papke *et al.*, resultados não publicados).

I.23- COMPOSIÇÃO QUÍMICA E PAPEL DOS LIPÍDEOS NA COMUNICAÇÃO DE ARANHAS

Como pode ser evidenciado nos exemplos apresentados, os feromônios presentes na cutícula ou na teia das aranhas exercem freqüentemente um papel de grande importância na comunicação, mas as informações sobre suas composições são limitadas. Os lipídeos, cuja função principal é o regulamento do

índice de água, podem ter papéis secundários de extrema importância na comunicação. A composição dos lipídeos da teia e da cutícula de aranhas foi revisada (Schulz, 1997a; Schulz, 1999). Estes lipídeos consistem principalmente de 2-metil alcanos com número de carbonos ímpar nas cadeias principais, com quantidades menores de álcoois, ácidos, aldeídos, e ésteres. Recentemente, uma análise completa dos lipídeos das teias e cutículas de *Nephila clavipes* (Schulz, 2001) revelou a presença de éteres metílicos de cadeias não ramificadas e ramificadas com cadeias carbônicas variando entre 25 e 45 átomos (**Tabela 4**).

Tabela 4- Ocorrência de alcanos e de éteres metílicos nos lipídeos da teia e cutícula de aranhas Linyphiidae.

	LTR	LTE	MIM	NMO	NEM
Éteres metílicos					
2,22-dimetil-C ₂₅ -OMe	•		◦	◦	◦
26-metil-C ₂₇ -OMe					•
26- metil -C ₂₈ -OMe	•	◦	◦	•	
2,26- dimetil -C ₂₈ -OMe	◦	◦	◦	•	
26- metil -C ₂₉ -OMe	◦	◦	◦	◦	◦
2,14,26-trimetil-C ₂₉ -OMe					•
28- metil -C ₃₀ -OMe	◦	◦	◦	•	
2,28- dimetil -C ₃₀ -OMe	•	◦		•	
2,28- dimetil -C ₃₁ -OMe	•	•			
2,30- dimetil -C ₃₂ -OMe	◦	◦	◦	•	
2,30- dimetil -C ₃₃ -OMe		•	•	◦	
18,22,26- trimetil-C ₃₆ -OMe				•	
Alcanos					
2- metilhexacosano	•	•	•	•	•
2- metiloctacosano	•	•	•	•	•

(•) presença nos extratos preparados das teias como compostos majoritários; (o) presença como compostos minoritários ou traços, () ausência. Os comprimentos das cadeias carbônicas dos éteres são indicados como, por exemplo, C₂₅, para o pentacosano. Espécies: **LTR**: *Linyphia triangularis*; **LTE**: *Linyphia tenuipalpis*; **MIM**: *Microlinyphia impigra*; **NMO**: *Neriere montana*; **NEM**: *Neriere emphana*.

Métodos para a identificação destes compostos foram publicados (Schulz, 1997b; Schulz, 2001). Até o momento, estes éteres foram encontrados nas famílias Linyphiidae (Schulz & Toft, 1993a), Tetragnathidae e Theridiidae (Schulz, 2001). Enquanto os alcanos encontrados nestas famílias são similares, em cada uma delas é encontrado um diferente grupo de éteres. Por exemplo, misturas diferentes de éteres metílicos foram encontradas nas teias de várias espécies pertencentes à família Linyphiidae, ao passo que a distribuição dos alcanos foi bastante similar (**Tabela 4**). Tem sido sugerido que éteres produzidos por aranhas seriam utilizados para o reconhecimento das espécies em um mecanismo de comunicação. Por outro lado, em sendo os hidrocarbonetos compostos produzidos por insetos em geral, poderiam estar contaminando os compostos de mesma natureza produzido pelas aranhas e encontrado em suas cutículas ou depositado nas suas teias (Schulz, 1997a; Schulz, 1999).

Outras classes de compostos encontrados apenas em aranhas envolvem ésteres propílicos de cadeia longa e ácidos carboxílicos ramificados, componentes identificados nas cutículas de *Anelosimus eximus* (Bagnères *et al.*, 1997).

II- OBJETIVOS

O objetivo central deste trabalho esteve direcionado ao desenvolvimento de conhecimentos que permitissem avaliar, propor e estabelecer instrumentos de monitoramento e redução de populações de *Loxosceles intermedia* em Curitiba e região metropolitana e novos sítios de infestação.

II.1- OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Estabelecimento de metodologias apropriadas de bioensaios de pesticidas domissanitários de uso corrente para controle peridomiciliar e intradomiciliar da aranha-marrom.
- b) Avaliação da eficácia de substâncias repelentes-desalojantes de uso corrente pela população e outras substâncias de baixa toxicidade ao ser humano.
- c) Estudar os aspectos relacionados à comunicação acústica-vibracional da aranha-marrom.
- d) Determinação da existência e identificação estrutural de semioquímicos mediando à comunicação intraespecífica da aranha-marrom.

III- PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

III.1- ASPECTOS GERAIS

Para o presente trabalho foram utilizados machos e fêmeas adultas ou sub-adultas de *L. intermedia* com largura do cefalotórax maior ou igual a 3 mm. Os indivíduos foram coletados no campo e a seguir mantidos em potes plásticos no laboratório. Nos potes plásticos foram adicionados pedaços de papel toalha como substrato, juntamente com algodão umedecido. As aranhas foram alimentadas a cada duas semanas aproximadamente com dieta a base de larvas de *Tenebrio molitor*, tatuzinhos de jardins e baratas da madeira. A temperatura durante os experimentos foi mantida entre 19 °C e 24 °C.

O presente estudo foi conduzido de acordo com a legislação nacional, tendo o local de realização dos experimentos autorização para coleta, transporte e manutenção de aranhas. Os experimentos foram realizados segundo as normas éticas de uso de animais em experimentação, sendo aprovado pelo comitê de ética da Universidade Tuiuti do Paraná. A coleção de referência foi tombada na coleção científica Vera Regina Von Eicksted no Centro de Produção e Pesquisa de Imunobiológicos (CPPI - Piraquara-Pr).

As análises de cromatografia gasosa foram efetuadas em um cromatógrafo Varian® 3800 equipado com coluna VA-5 (5% fenil-metilpolisiloxano) 30 m x 0,25 mm x 0,25 µm com detector de ionização de chama (FID) e He como gás de arraste, variando-se a temperatura de 60°C a 180°C, 5°C/min. As análises de

espectrometria de massas foram efetuadas em um equipamento Varian® CG MS/MS Saturn 2000, equipado com coluna CP-Sil 8 Low Bleed nas mesmas condições das análises efetuadas no cromatógrafo, exceto que a temperatura, neste caso, variou de 60°C a 230°C, 5°C/min.

Estudos relacionados à microscopia foram realizados no Centro de Microscopia Eletrônica da Universidade Federal do Paraná - UFPR em equipamento JEOL-JSM 6360 LV e no LACTEC - Instituto de Tecnologia para o Desenvolvimento em equipamento PHILIPS XL30.

Os sinais acústicos (tremulatórios e ou estridulatórios) emitidos foram gravados por um vibrômetro a laser (PDV 100, Polytec) e armazenados diretamente em um computador Cool Edit/Pro, (Syntrillium Software Corp. Phoenix). O tempo, a frequência e as características da velocidade dos sinais gravados foram analisados pelo programa Sound Forge 6.0 (Sonic Foundry Inc., Madison, Wisconsin). Os sinais acústicos transmitidos por via aérea foram gravados através de um microfone (modelo 4188, Brüel & Kjaer) acoplado a um analisador Integrado tipo 2238E, Brüel & Kjaer, o qual foi posicionado estrategicamente na arena. Os sinais emitidos foram armazenados e analisados mais tarde pelo programa Edit/Pro Sound Forge 6.0.

O sistema de aeração utilizado nos experimentos é composto por uma caixa em madeira com abertura frontal, possuindo as seguintes dimensões: 1,20 m de comprimento x 70 cm de largura x 1,0 m de altura, climatizada à 25°C⁰ e com umidade relativa controlada (70%). Esta é provida com um sistema de iluminação controlada (fotofase/escotofase), utilizando normalmente 14 h com iluminação por 10 h sem iluminação. As câmaras de aeração onde as aranhas foram

acondicionadas (7 a 10 indivíduos) eram de vidro (50 mm de diâmetro x 50 cm de comprimento). Os animais eram separados entre si através de uma tela metálica de malha 1 mm, medida necessária para evitar o canibalismo. Os sistemas de aeração consistiam de duas câmaras independentes, uma realizava a coleta de voláteis de machos enquanto a outra realizava a coleta dos voláteis das fêmeas. A vazão de fluxo de ar que passava pelas câmaras, 1 L/min, era controlada por um rotâmetro. O ar utilizado nas aerações passava previamente por filtros contendo carvão ativo, sendo posteriormente umidificado através da passagem por frascos borbulhadores contendo água destilada. Durante a coleta, os voláteis eram adsorvidos em 5 mm (0,5 g) de resina Super Q[®] (divinil benzeno/estireno 80-100 mesh) montada em uma coluna de vidro (10 mm de diâmetro x 15 cm de comprimento) com o auxílio de lã de vidro como suporte (5 mm, não muito compactada). A desorção do material retido na resina era efetuada com extração por solvente (2 mL de hexano com alto teor de pureza), já a concentração do extrato era realizada em frasco cônico através da passagem de um fluxo de argônio com vazão controlada, minimizando assim possíveis perdas de compostos voláteis.

III.2- AVALIAÇÃO DA EXISTÊNCIA DE INFOQUÍMICOS EM *Loxosceles intermedia*

III.2.1- INFOQUÍMICOS MEDIANDO COMUNICAÇÃO INTRAESPECÍFICA

O modelo de olfatômetro discriminante utilizado nos experimentos foi baseado em Vilela e Della Lucia (2001). A arena media 25 X 60 cm, divididos em quadrados de 5 cm de lado. Foi utilizado um ventilador acoplado a um tubo plástico de 15 cm de diâmetro interno, por 20 cm de comprimento, para circulação de ar. O filtro de ar era composto por carvão ativado, 2 cm de espessura, com grânulos de 2-3 mm, colocados entre telas metálicas com abertura de cerca de 1 mm. A distância entre o filtro e o início da arena era de 23 cm. A arena foi revestida por placas acrílicas de 2 mm de espessura no fundo e nas laterais. A placa que revestiu o fundo da caixa teve sua superfície lixada e o topo da arena foi coberta por vidro. As laterais da arena foram revestidas por tecido laminador e protegidas por tela metálica para impedir o contato das aranhas com o tecido. As gaiolas onde foram colocadas as aranhas utilizadas como estímulo foram construídas com tela metálica, com aproximadamente 6 cm de diâmetro e malha de 1 mm (**Figura 19, p. 77**).

Os estímulos e procedimentos foram os seguintes:

- **Fêmea com teia:** Deixadas na gaiola pelo menos dois dias antes dos experimentos.
- **Fêmea:** Uma fêmea era colocada na gaiola imediatamente antes de iniciar o experimento e depois a mesma era retirada e a gaiola lavada com álcool etílico absoluto antes do próximo experimento, para evitar que a mesma colocasse teia sobre o substrato.
- **Teia:** As fêmeas eram retiradas da gaiola com teia e o experimento era realizado entre 2 e 24 h após a retirada das mesmas.
- **Macho:** Os machos eram colocados na gaiola e testados entre 2 e 24 h depois.
- **Controle:** Somente a gaiola, sem nenhum animal dentro, servia como estímulo.

Utilizou-se para os experimentos apenas machos adultos como resposta. Observações experimentais realizadas durante o doutoramento de Ramires (1999), Co-Orientador deste projeto, evidenciaram a atração apenas de machos de *L.intermedia* por fêmeas (ambos adultos). As observações realizadas por Ramires levaram a hipótese da existência de infoquímicos estarem envolvidos na comunicação intra-específica da espécie, mais especificamente relacionada a reconhecimento e atração sexual, uma vez que tais observações faziam-se presentes apenas em indivíduos sexualmente maduros. A partir das observações

de Ramires, direcionou-se este trabalho no intuito da confirmação da existência de compostos mediadores de comunicação intra-específica da espécie e sua identificação.

O Procedimento experimental consistia na colocação de uma gaiola estímulo a qual foi fixada a uma distância de 10 cm da tela laminadora da arena.

Os machos de *L. intermedia* eram colocados na arena e após 15 minutos a gaiola resposta era aberta. Uma resposta era considerada como positiva quando o macho seguia até a gaiola ou até a linha transversal próxima a esta, sem voltar na direção oposta. Aguardavam-se no máximo 30 minutos após a abertura da gaiola.

Após cada experimento, as gaiolas resposta, a tela metálica em frente ao tecido laminador e as placas acrílicas eram lavadas com álcool absoluto e secadas em aquecedor de 1500 W de potência.

III.2.2- AERAÇÃO DE MACHOS E FÊMEAS DE *Loxosceles intermedia*

Neste experimento 7 fêmeas e 7 machos adultos foram colocados em câmaras de aeração distintas e separados por telas metálicas. Os voláteis foram carreados e coletados com fluxo de ar na vazão de 1 L/min sendo adsorvidos em resina Super Q[®]. O tempo de coleta dos voláteis variou entre 24 e 76 h e a desorção dos compostos adsorvidos na resina foi realizada através da eluição de 2 mL de hexano de alta pureza para preparação dos extratos. Os extratos foram concentrados em frasco cônico até cerca de 5µL através de um fluxo contínuo de argônio previamente purificado. Após a concentração do extrato, 1 µL deste foi analisado por cromatografia gasosa e cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas.

III.2.3- LAVAGEM DO CORPO DE MACHOS E FÊMEAS ADULTAS COM DICLOROMETANO

A lavagem das aranhas ocorreu por imersão das mesmas em frasco cônico contendo cerca de 2 mL de diclorometano de alta pureza por cerca de 10 segundos. Fez-se a utilização de pinça para manipulação das aranhas, assim como luvas de látex para proteção contra picada e para evitar contaminação dos extratos proveniente da manipulação. O extrato resultante da lavagem foi filtrado em pipeta de Pasteur contendo uma fina camada de algodão para efetuar a retenção de pêlos cuticulares, para concentração do extrato utilizou-se um fluxo contínuo de argônio previamente purificado. O extrato foi concentrado a um volume de 5 μ L em frasco cônico. Após a concentração do extrato, 1 μ L deste foi analisado por cromatografia gasosa e cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas.

III.2.3.1- TESTE COMPORTAMENTAL COM EXTRATOS OBTIDOS ATRAVÉS DA LAVAGEM DOS CORPOS DAS ARANHAS

Neste experimento utilizou-se pinça para manipulação das aranhas e luvas de látex para proteção contra picada. Os extratos foram obtidos através do processo de imersão das aranhas sexadas em frasco cônico contendo diclorometano de alta pureza por cerca de 10 segundos, em seguida efetuou-se a filtragem e concentração dos extratos sobre fluxo de gás argônio. Os extratos obtidos a partir da lavagem do corpo das fêmeas foram aplicados sobre papel filtro qualitativo marca “Qualy”, com 12,5 cm de diâmetro, gramatura 80 g/m², espessura 205 µm e 0,5 % cinza. Após evaporação do solvente os papéis de filtro foram expostos a machos e a fêmeas adultos, em experimentos distintos. Nestes experimentos foram registrados os padrões motores relacionados ao reconhecimento e cortejo (abertura de pedipalpos, movimento dos pedipalpos, movimento lento das pernas, comportamento de procura, toque no papel filtro com extrato, colocação de teia sobre substrato com extrato). A quantidade de extrato aplicada ao substrato diz respeito a uma fêmea-equivalente e o período de observação foi restrito a 20 minutos, sendo que cada indivíduo foi utilizado apenas uma vez.

III.2.3.2- TESTE COMPORTAMENTAL COM ACETATO DE GERANILA (14) E GERANIL ACETONA (15)

Os compostos **(14)** e **(15)**, dissolvidos em diclorometano, foram aplicados sobre papel filtro qualitativo, marca “Qualy”, com 12,5 cm de diâmetro, gramatura 80 g/m², espessura 205 µm e 0,5 % cinza. Após evaporação do solvente os papéis filtro foram expostos a machos e fêmeas, em experimentos distintos. Neste experimento os padrões motores relacionados a reconhecimento e cortejo (abertura de pedipalpos, movimento dos pedipalpos, movimento lento das pernas, comportamento de procura, toque no papel filtro com extrato, colocação de teia sobre substrato com extrato) foram registrados. Inicialmente a quantidade de extrato aplicada ao substrato dizia respeito a uma fêmea-equivalente (30 ng do acetato de geranila **(14)** e 60 ng da geranil acetona **(15)**), seguida por ensaios complementares para duas fêmeas-equivalentes. O período de observação foi de 20 minutos para cada experimento, sendo que cada indivíduo foi utilizado apenas uma vez.

III.3- COMUNICAÇÃO ACÚSTICA-VIBRACIONAL EM *Loxosceles intermedia*

Para o experimento foram utilizados grupos de 10 pares de indivíduos na seguinte combinação: fêmea e macho não lavados em acetona, fêmea não lavada e macho lavado, fêmea lavada e macho normal, macho lavado e fêmea lavada.

III.3.1- GRAVAÇÃO DOS SINAIS TRANSMITIDOS PELAS ARANHAS

Um macho e uma fêmea de *L. intermedia* foram colocados em um copo plástico (diâmetro 9,1 cm) com o fundo removido e colocado de cabeça para baixo sobre um papel branco (sulfite). Os sinais vibratórios e estridulatórios emitidos foram gravados por um vibrômetro a laser e os dados armazenados em computador. O período, frequência e as características da velocidade dos sinais gravados foram analisados por programas computacionais específicos (Edit/Pro Sound Forge 6.0). Os sinais acústicos transmitidos pelas aranhas por via aérea foram gravados através de um furo de 1 cm na lateral do copo, através de um sistema constituído por microfone (modelo 4188, Brüel & Kjaer) acoplado a um analisador Integrado tipo 2238E, Brüel & Kjaer.

As fêmeas foram introduzidas num recipiente circular de 9,1 cm de diâmetro, com superfície preparada para registro sonográfico, durante pelo menos 10 minutos antes da introdução dos machos. Os machos a seguir foram introduzidos no recipiente das fêmeas, sendo os sinais acústicos emitidos pelos indivíduos registrados, pelos 10 minutos seguintes, através do vibrômetro a laser (PDV 100, Polytec).

III.3.2- INFLUÊNCIA DA RETIRADA DOS PEDIPALPOS NO CORTEJO E CÓPULA

Aranhas da espécie *L. intermedia* com uma ou mais pernas perdidas não foram aproveitadas. Para se determinar quais indivíduos eram fêmeas adultas os mesmos deviam apresentar ovissacos ou então filhotes. A retirada dos pedipalpos foi realizada com a utilização de pinça, sem anestesia e as observações foram realizadas em laboratório sob penumbra. A iluminação (penumbra) consistiu de duas lâmpadas fluorescentes de 40 w, colocadas a 3,5 m do chão, conforme **Figura 20**, p 78.

III.4- AVALIAÇÃO PRELIMINAR COMPORTAMENTAL E DE TOXICIDADE DE COMPOSTOS SELECIONADOS AO CONTROLE DA ARANHA-MARROM

III.4.1- AVALIAÇÃO PRELIMINAR DE TOXICIDADE DOS COMPOSTOS

Os experimentos relacionados à mortalidade foram executados no Laboratório de Fauna Urbana da Universidade Tuiuti do Paraná (LAFUA), sob a Coordenação do Prof. Dr. Eduardo Novaes Ramires, co-orientador deste trabalho.

Utilizou-se potes plásticos de 500 mL de capacidade com pequenas perfurações em suas tampas, a fim de evitar concentração excessiva de voláteis nos potes. No fundo dos potes colocou-se um copo de Becker de capacidade de 10 mL contendo as amostras. Para os produtos em apresentação líquida (citronella, eucaliptol, óleo de pinho, amêndoa amarga, bergamota, óleo de cravo, capim limão, varsol, querosene, composto XY e composto Y) colocou-se 1 mL de material a ser analisado em cada copo de becker. Para os produtos em apresentação sólida, utilizou-se amostras com as seguintes massas médias: 0,85 g, cristais de cânfora; 0,85 g de paraformol; 1,95 g de naftalina (apresentação comercial unitária); 1,85 g de PDB; 0,85 g do composto X. Um pedaço de gaze foi preso à abertura do copo de Becker com fita adesiva para evitar contato do conteúdo em seu interior com as aranhas. Um indivíduo de *L. intermedia* foi a seguir introduzido em cada pote, e mantido por pelo menos 5 dias. Registros de mortalidade foram realizados em intervalos de tempo compreendidos entre 48 e 96 h, após a introdução das aranhas nos potes. Utilizou-se grupos de quatro indivíduos de *L. intermedia* para cada substância testada. Pesou-se o conteúdo de

dois potes para cada produto testado sem a introdução das aranhas, após a montagem e decorridas 96 h, a fim de estimar a perda de massa dos compostos durante o período dos experimentos.

O comportamento locomotor das aranhas foi registrado na primeira hora após a colocação das mesmas no pote, em intervalos de 5 minutos. Como controle de cada experimento, registrou-se o comportamento de aranhas colocadas em potes nos quais o copo de Becker estava sem produto. O comportamento registrado atentou-se ao fato locomotivo: locomoção e não locomoção das aranhas.

III.4.2- TESTE DE REPELÊNCIA-EFEITO DESALOJANTE SOBRE A ARANHA-MARROM

Utilizou-se para este experimento arenas experimentais constituídas de canos de PVC com 14,5 cm de diâmetro interno e 10 cm de altura. Na borda inferior do tubo entalhou-se três aberturas de 3,5 X 1,5 cm (Figura 39b, p. 116) eqüidistantes entre si. Em cada abertura da base encaixou-se uma caixa de fósforos (medidas externas: 3,5 x 1,5 x 4,7 cm) nunca antes usadas ou preenchidas com fósforos, fornecidas pelo fabricante. Retirou-se de uma das caixas sua parte de encaixe interna, e essa foi encaixada numa outra, que teve um centímetro de sua parte interna exposta. Realizaram-se dois cortes transversais de 0,2 x 2,5 cm na parede de sua parte de encaixe interna que as separava. Assim, as aranhas tinham uma área interna de 3,3 x 3,7 cm para abrigo (Figura 39c, p. 116). Colocou-se as substâncias repelentes em potes de plástico de 3,2

cm de diâmetro por 0,5 cm de altura, separadas das aranhas como acima descrito (Figura 39d, p. 116). Aplicou-se 0,5 mL de cada substância em apresentação líquida e aproximadamente 0,3 g de PDB, naftalina e composto X para testes distintos. Numerou-se de 1 a 3 as aberturas na base da arena, onde encaixaram-se as caixas. Nas aberturas 2 e 3 colocou-se caixas com os produtos a serem testados e na entrada 1 não colocou-se nenhuma substância (controle).

As arenas foram colocadas em posições angulares alternadas seqüencialmente (Figura 39b, p. 116). Colocaram-se as arenas sobre superfície de vidro polido, e após cada experimento efetuou-se a limpeza da superfície com álcool etílico absoluto.

Após a montagem da arena e colocação dos produtos a serem testados nas caixas, colocou-se uma aranha no centro de cada arena, presa em um pote plástico. Após 10 minutos retirou-se o pote plástico e iniciaram-se as observações.

Registrou-se a localização das aranhas (caixas numeradas ou arena) aos 15, 30 e 60 minutos e 24 horas após a colocação das mesmas na arena teste. A iluminação foi realizada por duas lâmpadas fluorescentes de 40 w, aproximadamente 3 m acima da bancada de experimentos. Aranhas do gênero *loxosceles* evitam geralmente áreas iluminadas, assim à presença de luz induzia as aranhas a escolher as caixas como refúgio. Utilizaram-se os indivíduos de *L. intermedia* apenas uma vez nos experimentos. Realizaram-se observações controle, sem produtos repelentes em nenhuma das caixas. O teste estatístico utilizado foi o χ^2 .

III.5- AVALIAÇÃO DA SUSCEPTIBILIDADE DE *Loxosceles intermedia* A PESTICIDAS PIRETRÓIDES

Os inseticidas utilizados para os testes de susceptibilidade foram os piretróides; lambda-cialotrina microencapsulada (Demand 2,5 CS), lambda-cialotrina (Icon 5 CS), deltametrina (K-Othrine CE 25) e cipermetrina (Cymperator 25 CE) que atualmente são recomendados para o controle de aranha-marron. Os experimentos seguiram os modelos recomendados pela Organização Mundial da Saúde para monitoramento da resistência a pesticidas (WHO, 1981; WHO, 1992).

Para os experimentos utilizou-se papel filtro qualitativo marca “Qualy” com 12,5 cm de diâmetro, gramatura 80 g/m², espessura 205 µm e 0,5 % cinza como substrato de aplicação dos pesticidas. Sobre placas de “Petri” colocou-se uma folha de papel filtro, sobre o qual adicionou, com auxílio de uma micropipeta, um volume de 2 mL do pesticida previamente preparado na concentração desejada. O solvente utilizado em todos os procedimentos, inclusive nos controles, foi à água como sugerido pelos fabricantes. Depois da impregnação, o material foi seco ao ar durante 24 horas individualmente em prato descartável e logo utilizado nos testes.

Inicialmente para cada inseticida avaliou-se uma bateria de 12 concentrações selecionadas ao acaso (concentrações recomendadas pelos fabricantes) com 4 repetições de 3 indivíduos cada uma, totalizando um valor de N=12 aranhas/concentração e 144 aranhas/experimento com os respectivos controles. Devido ao canibalismo foi necessário individualizar os tratamentos, sendo utilizado para cada aranha um pote descartável transparente de 12 cm de

diâmetro com aproximadamente 11 cm de altura. Este foi adequado com uma abertura na base para permitir a entrada de ar, estes potes foram virados de boca para abaixo, ficando a boca do pote tampada e prensada com o papel impregnado pelo pesticida, garantindo o contacto da aranha com o produto. Dê posse dos resultados anteriores foram determinados os limites de mortalidade entre 1 e 99%.

Só após a calibração das concentrações dos pesticidas, efetuou-se a seleção de 7 experimentos mais o controle. No geral o esquema experimental segue os modelos de Robertson & Preisler (1992) para bioensaios com artrópodes. A leitura de mortalidade foi realizada com: 2, 4, 12 e 24 horas, a determinação das concentrações letais $CL_{50, 95}$, foi realizada pelos testes de χ^2 , inclinação e intervalos de confiança foram determinados por Probit GW-Basic (Finney 1971).

III.6- PROCEDIMENTOS ESTATÍSTICOS

Para análise da frequência de cópulas nas diferentes manipulações experimentais, foi considerado como esperado a frequência de cópula obtida entre machos e fêmeas com pedipalpos intactos e sem lavagem em acetona.

Em testes em que o N amostral foi inferior a 10 animais, utilizou-se o teste exato de Fisher, enquanto que nos demais testes de frequência foi utilizado o teste do χ^2 (qui-quadrado) considerando como significativo $P < 0,05$.

Para análise da seqüência e estabilidade dos sinais vibratórios foi utilizado o teste paramétrico ANOVA.

Para a determinação dos padrões motores relacionados com o reconhecimento do extrato foi analisado o comportamento exibido pelos animais (jovens, machos e fêmeas) em contato com os extratos das fêmeas e dos machos através da análise de correspondência. Então, para verificação de diferenças nas respostas diante dos extratos ou dos compostos foi considerado o número médio de padrões motores exibidos por cada categoria e comparados pelos testes não paramétricos Kruskal-Wallis (Teste H) e Mann-Whiney (Teste U), uma vez que os dados não apresentavam distribuição normal.

Para os experimentos envolvendo a determinação da ação de substâncias inseticidas e repelentes frente à aranha-marrom foi utilizado o teste χ^2 (qui-quadrado).

IV - RESULTADOS E DISCUSSÕES

IV.1- AVALIAÇÃO EXPERIMENTAL DA EXISTÊNCIA DE INFOQUÍMICOS EM *Loxosceles intermedia*

IV.1.1- INFOQUÍMICOS MEDIANDO COMUNICAÇÃO INTRAESPECÍFICA

O estudo visando a determinação de possíveis infoquímicos mediando a comunicação intraespecífica de *L. intermedia* foi iniciado com ensaios comportamentais que avaliaram a atração entre indivíduos de sexo opostos. O modelo de olfatômetro discriminante (**Figura 18**) utilizado neste experimento foi baseado em Vilela e Della Lucia (2001).



Figura 18- Olfatômetro discriminante

Desta forma, machos foram liberados em uma extremidade da arena contra um fluxo de ar que passava por fêmeas adultas confinadas em uma gaiola de tela metálica (**Figura 19**) posicionadas na outra extremidade da arena. Observações realizadas por Ramires (1999) durante seu doutoramento demonstraram que

apenas fêmeas exerciam atração sobre machos (ambos adultos), fato que revelava a possibilidade de feromônio sexual ser responsável por tal comportamento. Com base em tais observações realizou-se testes em olfatômetro discriminante utilizando-se como estímulos: fêmea com teia, fêmea sem teia, somente teia e machos (animais adultos), sempre tendo machos empregados como resposta.

A gaiola onde foram colocadas as aranhas utilizadas como estímulo foram construídas de tela metálica, com aproximadamente 6 cm de diâmetro e malha de 1mm entre vãos, **Figura 19**.

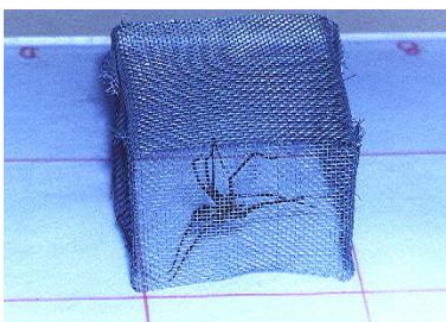


Figura 19- Gaiola onde foram colocadas as aranhas utilizadas como estímulo.

Durante experimentos envolvendo a utilização de olfatômetro discriminante para o estudo da comunicação intra-específica da espécie *L. intermedia*, utilizou-se a iluminação penumbra. Este tipo de iluminação consistia de duas lâmpadas fluorescentes de 40 w, colocadas a 3,5 m do chão, conforme a **Figura 20**.



Figura 20- Iluminação “penumbra” utilizada durante experimentos com olfatômetro.

Esta forma de iluminação faz-se necessário para evitar possíveis interferências nos testes comportamentais, minimizando assim falsas locomoções dos indivíduos em teste, uma vez que estas aranhas procuram ambientes com pouca luminosidade como forma de abrigo.

Os resultados mais relevantes obtidos nos experimentos com olfatômetro discriminante estão sumarizados na **Tabela 5**.

Tabela 5- Resultados dos experimentos em olfatômetro discriminante

	FCT	FST	C	T	M
Positiva	16	15	9	8	8
Negativa	4	5	11	12	12

Legenda: (**FCT**: fêmea com teia; **FST**: fêmea sem teia; **C**: controle; **T**: teia; **M**: macho)

Os resultados comprovaram a atração de machos quando submetidos a um fluxo de ar que passava pelo corpo de fêmeas (ambos adultos), indicando a possibilidade de haver compostos químicos mediando tal comportamento.

IV.1.2- AERAÇÃO DE MACHOS E FÊMEAS

De posse desses resultados iniciou-se a aeração de machos e fêmeas adultos visando a coleta dos compostos voláteis emitidos pelos mesmos (Figura 21).



Figura 21- A figura (a) representa uma visão geral do sistema de aeração; (b) representa em detalhes o confinamento de uma fêmea de *L. intermedia*.

Os indivíduos foram separados no interior da câmara de aeração por uma tela metálica para evitar o canibalismo ou qualquer comportamento de ataque o que poderia estimular a emissão de compostos não desejáveis.

Os voláteis obtidos na aeração de machos e fêmeas de *L. intermedia* após período pré estabelecido para coleta (geralmente 48 ou 72 horas), foram dessorvidos da resina adsorvente (Super-Q[®]) através da extração com hexano. Os extratos foram então concentrados sob fluxo de argônio e analisados por cromatografia gasosa capilar. Nos extratos obtidos através da aeração das fêmeas

observou-se a presença de dois compostos, não presentes nos extratos obtidos através da aeração de machos.

Através da análise por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM) dos extratos das fêmeas identificou-se os compostos como sendo acetato de geranila **(14)** e geranil acetona **(15)**.

A **Figura 22**, a seguir demonstra de forma objetiva as principais diferenças entre os extratos de aeração de fêmeas e machos aerados, com destaque aos picos referentes aos compostos **(14)** e **(15)** presentes apenas nos extratos de fêmeas.

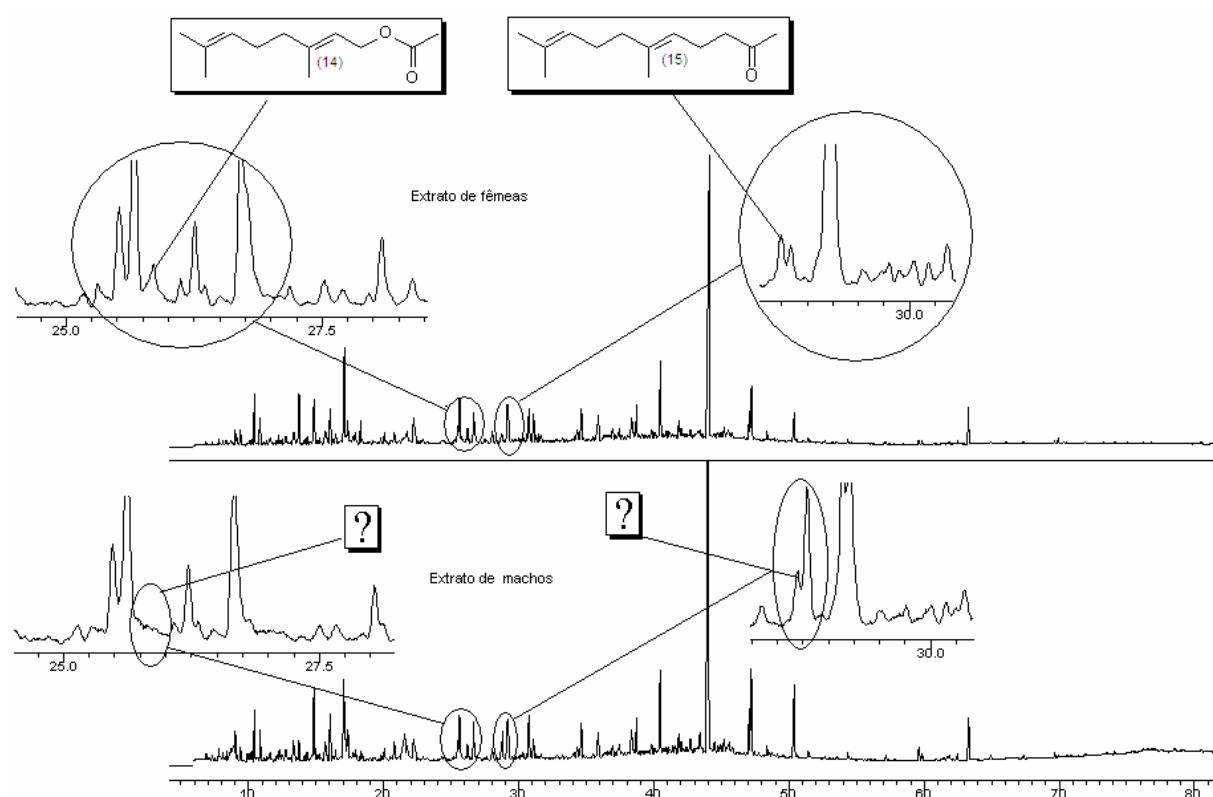


Figura 22- Cromatogramas de extratos de fêmeas e machos aerados.

Os compostos, acetato de geranila (**14**) e geranil acetona (**15**) foram identificados através da técnica de cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas, bem como pela comparação de seus índices de Kovats com padrões disponíveis comercialmente.

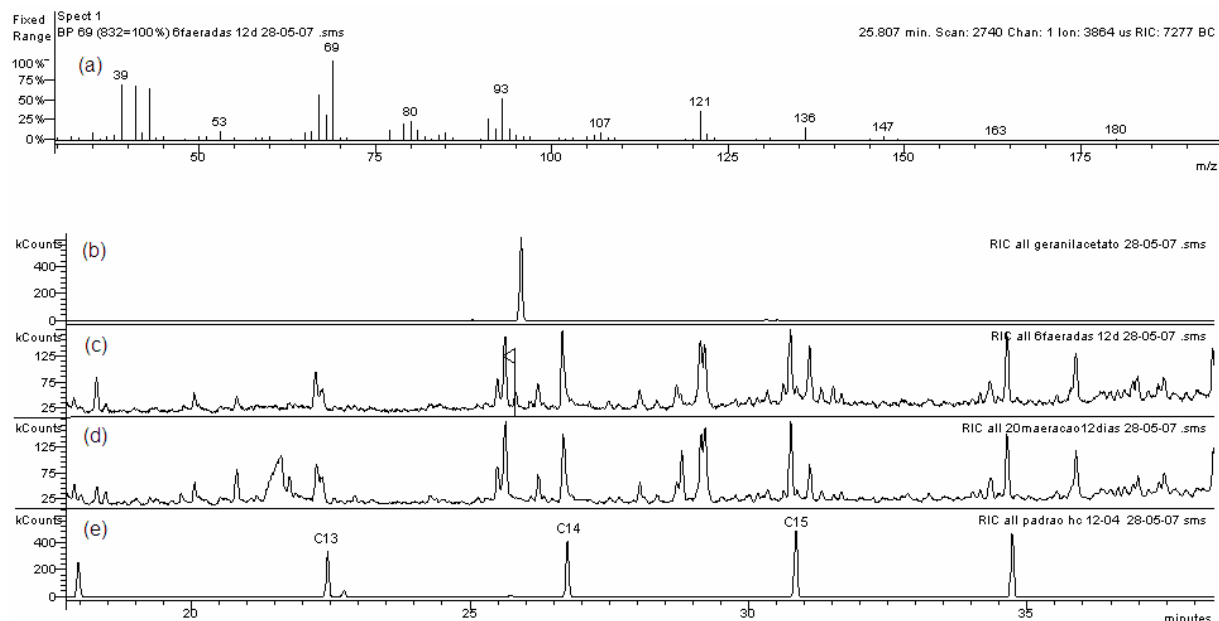


Figura 23- (a) Espectro de massas do acetato de geranila (**14**) e (b) cromatogramas do padrão de acetato de geranila, (c, d) extratos de machos e fêmeas aerados e (e) padrões de *n*-alcanos.

O acetato de geranila (**14**), identificado no extrato da aeração de fêmeas, apresentou, entre outros, os fragmentos $(M+H)^+$ ($m/z = 197$) e $m/z = 69$, sendo este último o pico base. Estas fragmentações são coerentes com a estrutura do composto, conforme apresentado na **Figura 24**.

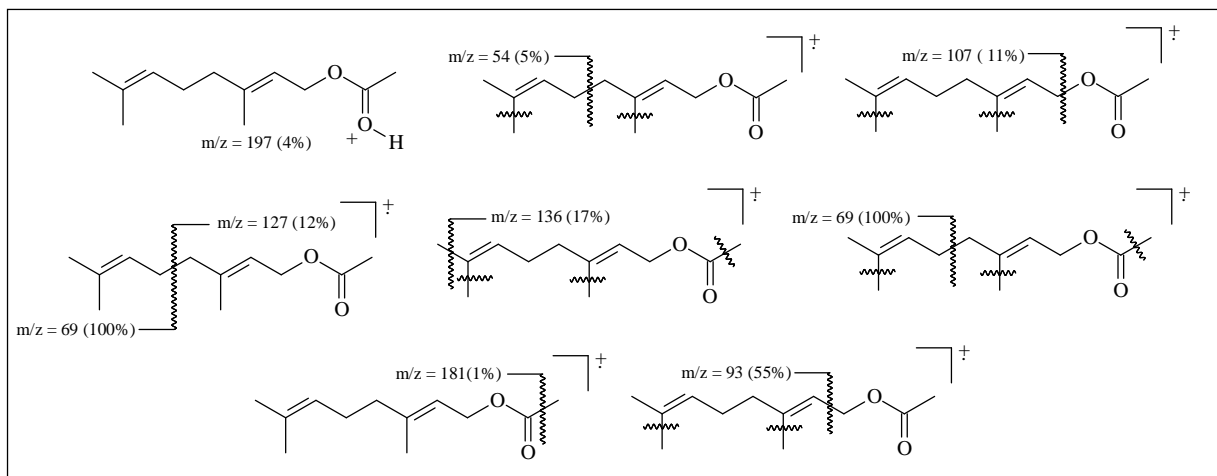


Figura 24- Propostas de fragmentação do composto **(14)**.

A **Tabela 6** apresenta valores referentes ao cálculo do índice de Kovats para o composto **(14)** identificado no extrato de fêmeas aeradas e seu correspondente sintético.

Tabela 6- Resultados obtidos para o cálculo do índice de Kovats do acetato de geranila **(14)**.

Parâmetros de análise						Identificação	
Cn	Cn-1	Tn (min)	Tn-1 (min)	Tx (Amostra/ min)	IR (Kovats)	Compostos	Origem
14	13	26,74	22,43	25,800	1378	acetato de geranila	EXTRATO
14	13	26,74	22,43	25,910	1381	acetato de geranila	PADRÃO SINTÉTICO

n: número de carbonos do alcano linear com tempo de retenção superior ao da amostra

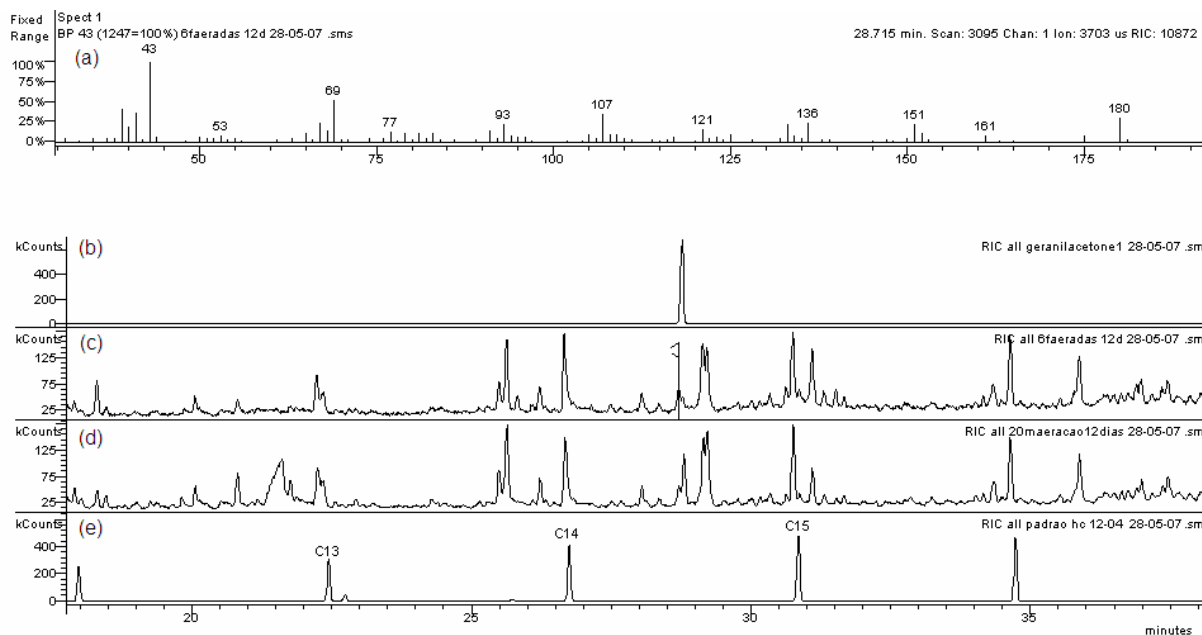


Figura 25- (a) Espectro de massas da geranyl acetona (**15**) e (b) cromatogramas do padrão de geranyl acetona, (c e d) extratos de machos e fêmeas e (e) padrões de *n*-alcanos.

A geranyl acetona (**15**) também identificada no extrato de aeração de fêmeas apresentou como fragmentações características o $(M+H)^+$, ($m/z = 195$) e como pico base $m/z = 43$, sendo este resultante da clivagem das ligações C-C adjacentes a carbonila.

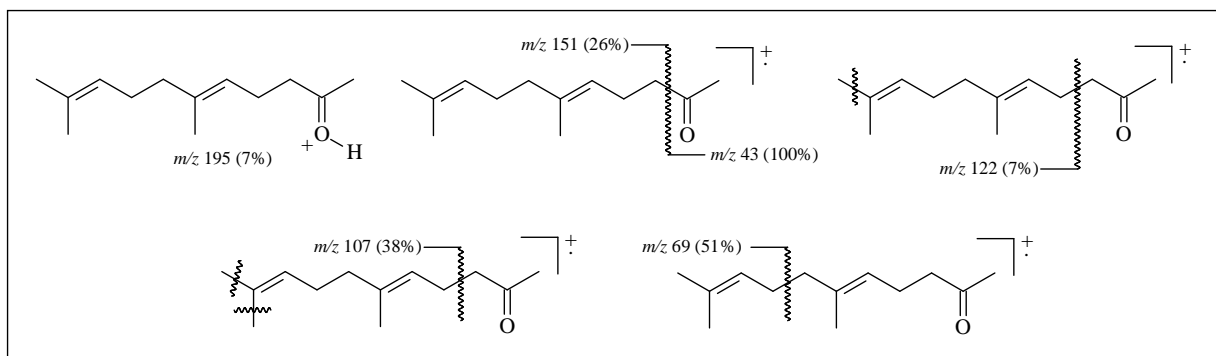


Figura 26- Propostas de fragmentações do composto **(15)**.

A **Tabela 7** apresenta valores referentes ao cálculo do índice de Kovats para a geranil acetona identificada no extrato e seu correspondente sintético.

Tabela 7- Resultados obtidos para o cálculo do índice de Kovats da geranil acetona **(15)**.

Parâmetros de análise						Identificação	
Cn	Cn-1	Tn (min)	Tn-1 (min)	Tx (Amostra/ min)	IR (Kovats)	Compostos	Origem
15	14	30,84	26,74	28,710	1448	geranil acetona	EXTRATO
							PADRÃO
15	14	30,84	26,74	28,770	1450	geranil acetona	SINTÉTICO

n: número de carbonos do alcano linear com tempo de retenção superior ao da amostra

IV.1.3- LAVAGEM DO CORPO DE MACHOS E FÊMEAS ADULTOS COM DICLOROMETANO

Paralelamente à preparação de extratos de fêmeas e machos através da técnica de aeração, optou-se também por preparar extratos através da lavagem dos corpos das aranhas. Desta forma, fêmeas e machos foram submersos em diclorometano por alguns segundos, separadamente, para a retirada dos compostos cuticulares. Os extratos assim obtidos foram concentrados sob fluxo de argônio e analisados por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM). Uma vez mais foi possível detectar a presença de acetato de

geranila (14) e geranil acetona (15), apenas no extrato obtido pela lavagem dos corpos das fêmeas (Figura 27).

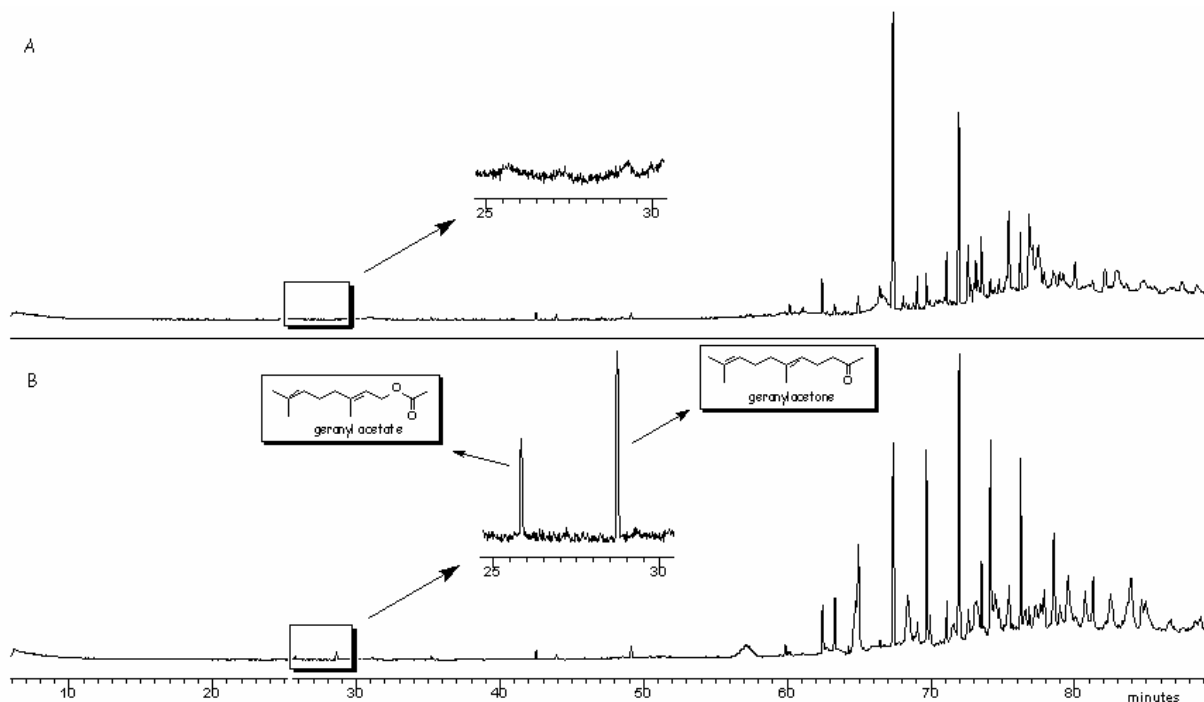
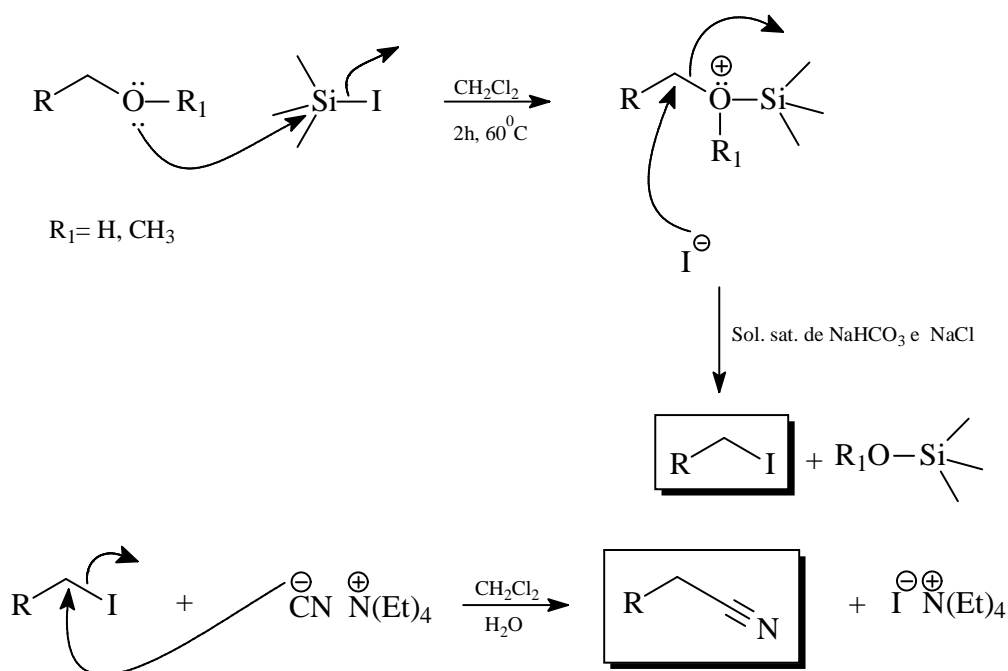


Figura 27- Perfil cromatográfico obtido após a lavagem de machos **(a)** e de fêmeas **(b)** de *L. intermedia* com diclorometano.

Compostos com tempo de retenção superior ao acetato de geranila **(14)** e a geranil acetona **(15)** foram observados em extratos de ambos os sexos. Tais compostos também foram analisados e identificados pela técnica de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas como sendo alcanos de cadeias lineares, alcanos de cadeias ramificadas, ácidos graxos de cadeia longa, álcoois e álcoois sililados, conforme **Tabela 8**. Os alcanos de cadeias lineares e ramificadas foram identificados pela comparação de seus tempos de retenção e

fragmentações com padrões. Os compostos funcionalizados de cadeias ramificadas foram identificados através da metodologia desenvolvida pelo Dr. Stefan Schulz, colaborador deste projeto. Compostos de maior massa molecular presentes nos corpos das aranhas, são conhecidos como compostos cuticulares, normalmente são importantes não apenas na comunicação química intraespecífica, mas também agem como protetores da cutícula (ceras), tendo importante papel na regulação da perda de água nas aranhas (Schulz, 2004). O Dr. S. Schulz, desenvolveu uma metodologia que permite em alguns casos específicos à identificação da posição de metilas ao longo de uma cadeia carbônica mesmo em misturas complexas e com pouca quantidade de material (Schulz, 1997). Esta metodologia baseia-se na formação de nitrilas a partir de álcoois ou éteres metílicos, os quais primeiramente são transformados nos respectivos iodetos pela utilização de Me_3SiI , seguidos pela conversão em nitrilas utilizando-se como reagente Et_4NCN em diclorometano. O **Esquema 1**, demonstra o mecanismo envolvido no processo de obtenção das nitrilas a partir de álcoois e éteres metílicos.



Esquema 1- Mecanismo envolvido nos processos de conversão de álcoois e éteres metílicos em nitrilas.

A opção pela formação de iodeto como intermediário chave no processo de microderivatização é devido ao fato deste ser excelente grupo abandonador, facilitando a formação das nitrilas via processo de substituição nucleofílica bimolecular.

As nitrilas são funções que não sofrem fragmentações facilmente quando submetidas às condições de análise via CG-EM, possibilitando a localização das ramificações, metilas na maioria dos casos, como é possível observar na **Figura 28**.

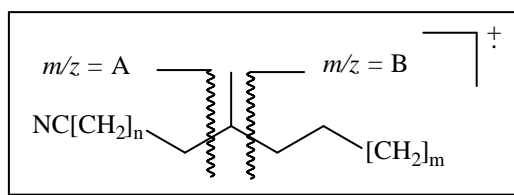


Figura 28- As fragmentações A e B são características em nitrilas substituídas por metilas.

A **Figura 29** a seguir, apresenta fragmentações referentes a nitrilas sintéticas e nitrilas obtidas a partir de microderivatizações realizadas nos extratos obtidos da lavagem das teias de *Nephila clavipes* (Schulz *et al.*, 1997).

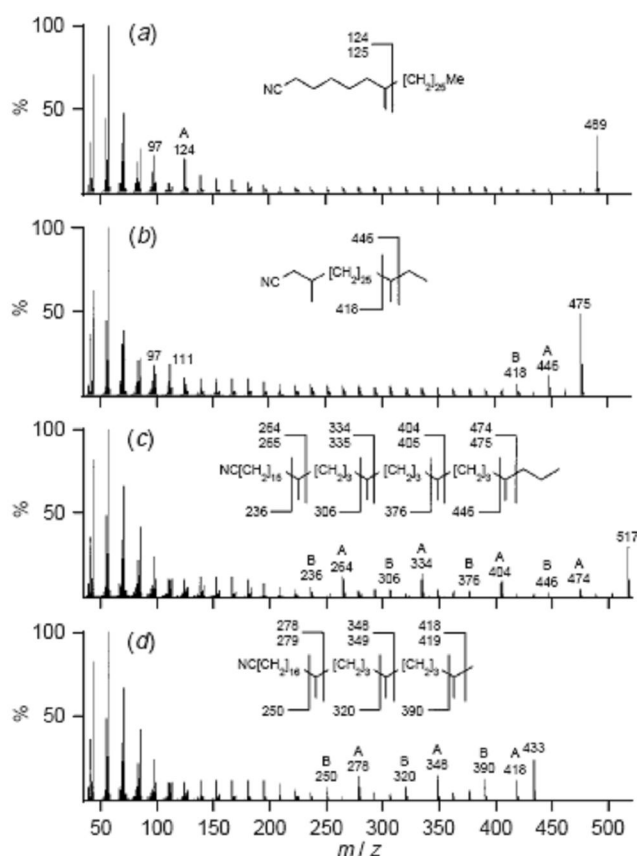


Figura 29- Espectros de massas (IE, 70 eV) de: **(a)** Cianeto de 6-metildotriacontila (sintético); **(b)** Cianeto de 2, 28- dimetiltriacontila (*N. clavipes*); **(c)** Cianeto de 16, 20, 24, 28- tetrametilentriacontila (*N. clavipes*); **(d)** Cianeto de 17, 21, 25- trimetilexacosila (sintético).

A metodologia desenvolvida por Schulz, foi aplicada com sucesso na identificação dos compostos: 1-metoxi-16, 20, 24, 28-tetrametilentriacontano e 1-metoxi-2, 28-dimetiltriacontano (éteres metílicos ramificados por metilas), presentes nos extratos preparados a partir da lavagem das teias de *N. clavipes* (Schulz, *et al.*, 1997).

Para os *n*-alcanos de elevada massa molar, substituídos por grupos metilas, o espectro de massas apresenta fragmentações características, geralmente na posição α ao substituinte, fato que facilita a localização da substituição.

A **Figura 30**, apresenta fragmentações clássicas observadas em espectros de massas obtidos a partir de hidrocarbonetos ramificados.

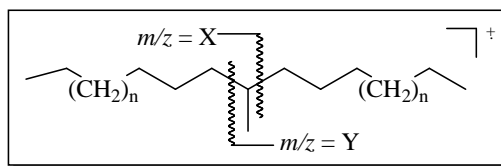


Figura 30- Fragmentações observadas em *n*-alcanos de cadeia longa ramificados por metilas.

Este tipo de estrutura apresenta valores de m/z para X e Y, característicos à fragmentação α à posição da ramificação.

A **Tabela 8**, a seguir apresenta os compostos cuticulares identificados nos extratos de *L. intermedia* pelas metodologias preliminarmente apresentadas. Estes compostos foram identificados em colaboração com o Dr. Stefan Schulz.

Tabela 8- Compostos identificados em extratos obtidos pela lavagem de machos e fêmeas de *L. intermedia* com diclorometano.

Compostos identificados nos extratos cuticulares de machos e fêmeas de <i>L. intermedia</i>	Composto presente no extrato de fêmeas	Composto presente no extrato de machos
C_{16}/C_1^*		X
C_{18}/C_1^*		X
$C_{12}H_{20}O_2$ acetato de geranila (14)	X	
$C_{13}H_{22}O$ geranil acetona (15)	X	
$C_{23}H_{48}$	X	
$C_{24}H_{50}$	X	X
$C_{25}H_{52}$	X	X
C_{11}, C_{13} -di-Me/ $C_{25}H_{50}$		X
C_3 -Me/ $C_{25}H_{51}$	X	
$C_{26}H_{54}$	X	X
C_2 -Me/ $C_{26}H_{53}$	X	X
$C_{27}H_{56}$	X	X
C_{11}, C_{13} -di-Me/ $C_{27}H_{54}$	X	X
C_9 -Me/ $C_{27}H_{55}$	X	X
C_7 -Me/ $C_{27}H_{55}$	X	X
C_5 -Me/ $C_{27}H_{55}$	X	
C_9, C_{13} -di-Me/ $C_{27}H_{54}$	X	
C_2 -Me/ $C_{27}H_{55}$	X	X
C_3 -Me/ $C_{27}H_{55}$	X	X
$C_{28}H_{58}$	X	X
$C_{12}, C_{13}, C_{14}, C_{15}$ -tetra-Me/ $C_{28}H_{54}$	X	X
X-Me-HC		X
C_2 -Me/ $C_{28}H_{57}$	X	X
C_3 -Me/ $C_{28}H_{57}$	X	X
C_2, C_6 -di-Me/ $C_{26}H_{52}$	X	X
$C_{29}H_{60}$	X	X
C_{11}, C_{13}, C_{15} -tri-Me/ $C_{29}H_{57}$	X	X

C ₉ -Me/C ₂₉ H ₅₉	X	X
C ₂₆ H ₅₃ O-TMS	X	
C ₇ -Me/C ₂₉ H ₅₉	X	X
C ₅ -Me/C ₂₈ H ₅₇	X	X
C ₁₁ ,C ₁₅ -di-Me/C ₂₉ H ₅₈	X	X
C ₉ ,C ₁₃ -di-Me/C ₂₉ H ₅₈	X	X
C ₂ -Me/C ₂₉ H ₅₉	X	X
C ₃ -Me/C ₂₉ H ₅₉	X	X
C ₇ ,C ₁₁ ,C ₁₅ -tri-Me/C ₂₉ H ₅₇	X	
C ₃₀ H ₆₂	X	X
C ₃ ,C ₇ -di-Me/C ₂₉ H ₅₈	X	X
C ₂ /C ₂₆	X	X
HC	X	X
C ₂ -Me/C ₃₀ H ₆₁	X	
C ₁ /C ₂₈	X	X
C ₂ ,C ₆ -di-Me/C ₂₈ H ₅₆	X	X
C ₃₁ H ₆₄	X	X
C ₁₁ ,C ₁₃ ,C ₁₅ -tri-Me/C ₃₁ H ₆₁	X	X
C ₂ /C ₂₇	X	
C ₂₈ H ₅₇ O-TMS	X	
C ₉ -Me/C ₃₁ H ₆₃	X	X
C ₇ -Me/C ₃₁ H ₆₃	X	X
C ₁₁ ,C ₁₅ -di-Me/C ₃₁ H ₆₂	X	X
C ₅ -Me/C ₃₁ H ₆₃	X	X
C ₁₃ ,C ₁₇ -di-Me/C ₃₁ H ₆₂	X	X
C ₉ ,C ₁₃ -di-Me/C ₃₁ H ₆₂	X	X
C ₂ -Me/C ₃₁ H ₆₃	X	X
C ₂₆ -OH ?	X	
C ₃ -Me/C ₃₁ H ₆₃	X	X
C ₃₂ H ₆₆	X	X
C ₂ /C ₂₈	X	X
HC		X
C ₂ -Me/C ₃₂ H ₆₅	X	
C ₁ /C ₃₀	X	
HC	X	X

C ₃₃ H ₆₇	X	X
C ₁₁ ,C ₁₃ ,C ₁₅ , C ₁₇ tetra-Me/C ₃₃ H ₆₄	X	X
C ₂ /C ₂₉	X	X
C ₉ -Me/C ₃₃ H ₆₇	X	X
C ₃₀ H ₆₁ O-TMS	X	
C ₇ -Me/C ₃₃ H ₆₇	X	X
X,X-di-Me/C ₃₃ H ₆₆		X
C ₁₁ ,X-di-Me-C ₃₃ H ₆₆	X	X
C ₁₁ ,C ₂₁ -di-Me-C ₃₃ H ₆₆	X	X
HC	X	X
C ₂ -Me/C ₃₃ H ₆₇	X	
C ₅ ,C ₁₃ -di-Me-C ₃₃ H ₆₆	X	
C ₃ -Me/C ₃₃ H ₆₇	X	
HC	X	X
C ₂ /C ₃₀	X	
C ₃₄ H ₇₀	X	
C ₃₀ H ₆₁ -OH	X	
C ₁₁ ,C ₁₃ ,C ₁₅ , C ₁₇ /C ₃₃ H ₅₈	X	X
C ₂ /C ₃₁	X	
C ₁₃ ,C ₂₃ -di-Me-C ₃₅ H ₇₀	X	X
C ₁₁ ,C ₂₃ -di-Me-C ₃₅ H ₇₀	X	
C ₇ -Me/C ₃₅ H ₇₁	X	
C ₅ -Me/C ₃₅ H ₇₁	X	
HC	X	X
HC	X	X
X-Me/C ₃₅ H ₇₁	X	
X, X-di-Me/C ₃₅ H ₇₀	X	
C ₃₀ H ₆₁ -OH	X	
Total de compostos identificados até o momento	84	62

* indica a posição da insaturação na cadeia carbônica; X-representa a posição de metilas não localizadas; HC- hidrocarbonetos não identificados.

Existe a presença de vários isômeros de hidrocarbonetos (HC) com cadeias carbônicas variando entre C₃₃ e C₃₅ de difícil caracterização. Verificou-se também nos extratos a presença de álcoois, ácidos carboxílicos e ésteres com cadeias carbonílicas que variam entre C₁₆ e C₂₈.

IV.1.3.1- TESTES COM OS EXTRATOS OBTIDOS ATRAVÉS DA LAVAGEM DOS CORPOS DAS ARANHAS

A atividade dos extratos obtidos pela lavagem dos corpos de indivíduos machos, adultos e jovens de *L. intermedia* foi avaliada em colaboração com a Dra. Marta Luciane Fischer da PUC-PR.

Estes testes consistiam em adicionar a um pedaço de papel de filtro (substrato) quantidade de extrato equivalente a um indivíduo de *L. intermedia* e observar o comportamento do outro indivíduo em contato com o papel, conforme **Figura 31**.



Figura 31- Bioensaios com extratos obtidos pela lavagem dos corpos das aranhas. Macho de *L. intermedia* em contato com papel filtro contendo extrato.

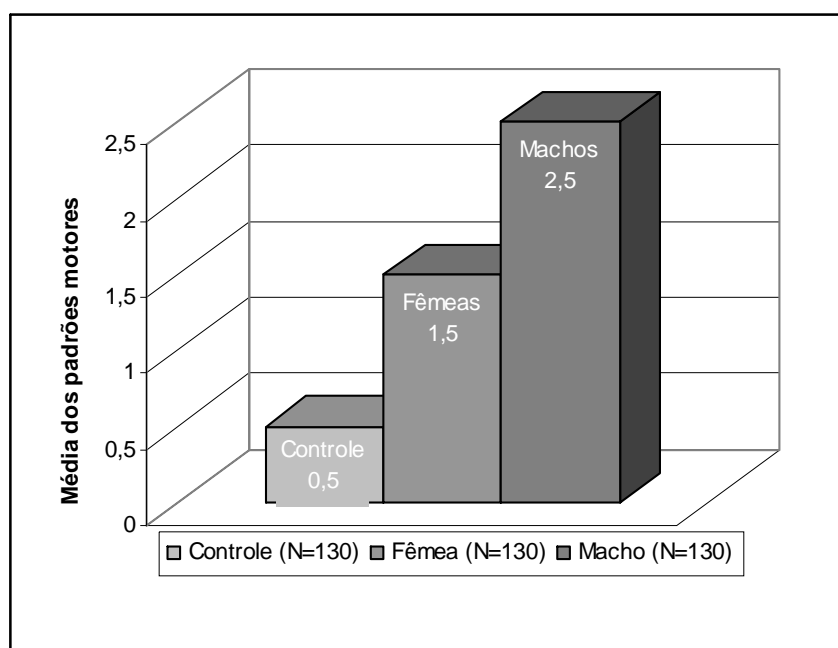
Todas as combinações envolvendo extratos de fêmeas, machos e jovens foram efetuadas. Os padrões motores observados foram:

- a) manter-se imóvel
- b) mover-se inicialmente e parar
- c) movimentos lentos
- d) toques sucessivos no substrato
- e) colocação de teia
- f) movimento de procura: a aranha se movimenta lentamente esticando as pernas lateral e frontalmente, tocando o substrato sucessivamente
- g) separação dos pedipalpos
- h) vibração dos pedipalpos
- i) saída do frasco
- j) manter-se em repouso

Os padrões motores de c a h estão diretamente relacionados com o reconhecimento da espécie, normalmente observado quando estas aranhas são postas em contato, **Figura 32**.

Todos os padrões citados apresentaram resultados pronunciados quando indivíduos entraram em contato com os extratos das fêmeas, conforme ilustrado a seguir no **Gráfico 3**.

Gráfico 3- Média de frequência de ocorrência dos padrões motores observados nos bioensaios.



Através da análise de correspondência pode-se perceber que os padrões motores intrínsecos ao cortejo estão mais diretamente relacionados quando os indivíduos são expostos ao extrato das fêmeas, conforme **Figura 32**.

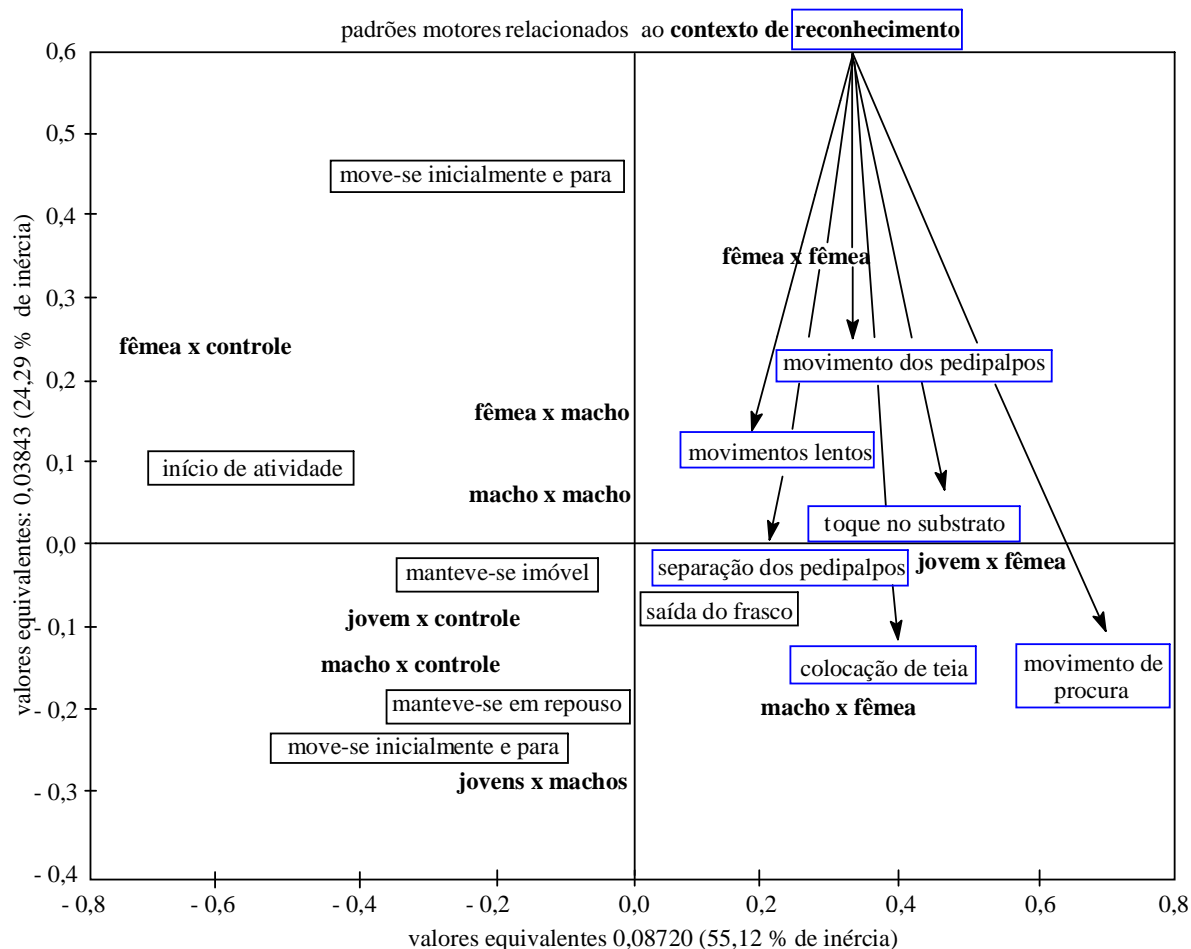


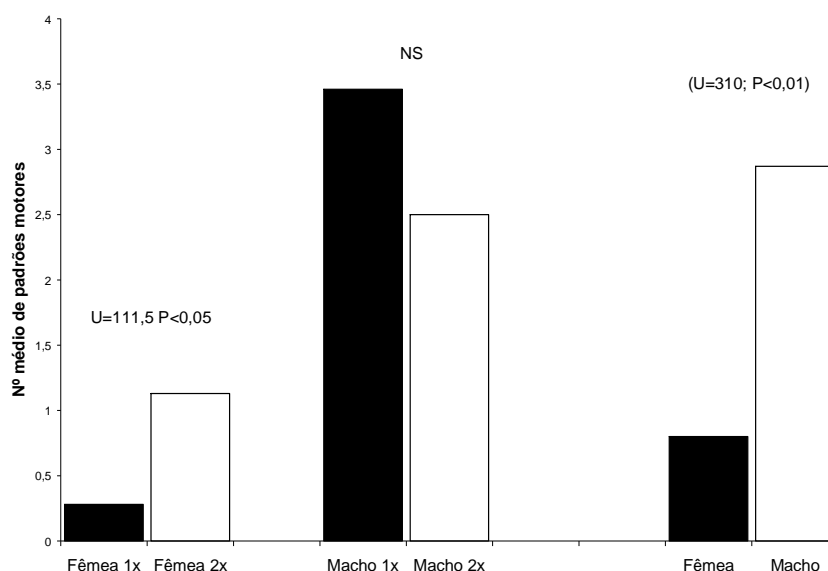
Figura 32- Teste de correspondência efetuado com os resultados comportamentais dos extratos corpóreos.

Estes resultados, aliados aos resultados obtidos com o bioensaio envolvendo o olfatômetro discriminante, mostraram que as fêmeas, a longa distância, exercem certa atração frente aos machos e que a curta distância o extrato das fêmeas estimulam mais a apresentação dos padrões motores relacionados ao reconhecimento da espécie, tanto em machos quanto em fêmeas.

IV.1.3.2- TESTE COMPORTAMENTAL COM ACETATO DE GERANILA E GERANIL ACETONA

Teste comportamental foi efetuado com os dois compostos observados apenas nos extratos das fêmeas. O primeiro teste foi efetuado aplicando-se uma solução em diclorometano dos compostos, contendo 30 ng de **(14)** e 60 ng de **(15)**, ou seja, uma fêmea-equivalente, em um pedaço de papel filtro. Os padrões motores relacionados ao cortejo (abertura de palpos, movimento palpos, movimento lento das pernas, comportamento de procura, toque no substrato, colocação de teia sobre substrato) foram registrados. Os machos exibiram uma maior média de padrões motores do que as fêmeas ($U = 310$, $P < 0,01$). Não observou-se variação no número dos padrões motores exibidos por machos ao se empregar duas fêmeas-equivalentes. Já para as fêmeas, o número de padrões motores exibidos, aumentou ao se empregar a solução contendo duas fêmeas-equivalentes, **Gráfico 4**.

Gráfico 4- Resultado dos testes comportamentais realizados com acetato de geranila e geranil acetona.



Outros testes estão sendo efetuados variando-se a quantidade dos compostos para se verificar o limite de resposta das fêmeas frente à concentração dos mesmos.

Esses resultados, no entanto, indicam que os compostos presentes apenas nos extratos das fêmeas, sinalizam para o macho o sexo do outro indivíduo, ou seja, aparentemente, os compostos cuticulares, presentes nos extratos de ambos os sexos, indicariam a espécie dos animais enquanto que os compostos presentes apenas nos extratos das fêmeas, consistiriam de mensagens químicas empregadas para reconhecimento do sexo.

Uma vez estabelecido o reconhecimento de espécie e sexo, o cortejo teria seqüência com a comunicação acústica-vibracional, até a cópula. Também será avaliada a eficiência do acetato de geranila e da geranil acetona em estabelecer comunicação a longa distância com os machos, em caso positivo isto terá efeito no desenvolvimento de armadilhas seletivas para captura desta importante espécie de aranha.

De qualquer forma, os resultados acumulados até o momento, indicam que estes dois compostos produzidos apenas pelas fêmeas constituem a mistura feromonal sexual desta espécie de aranha, importante resultado tendo-se em vista que na literatura se encontra o relato da identificação de apenas três feromônios de aranhas e nenhuma delas se constitui em importante caso de saúde pública como ocorre com a *L. intermedia*.

IV.2- AVALIAÇÃO DA COMUNICAÇÃO ACÚSTICA-VIBRACIONAL EM *L. intermedia*

As aranhas se comunicam com sinais de diferentes modalidades (Barth, 2002). Entre estes sinais incluem-se os visuais (Clark & Uetz, 1990, 1993; Clark & Morjan, 2001; Clark & Biesiadecki, 2002), químicos (Schulz, 2004), sísmicos (através de substratos) (Jackson, 1977; Elias *et al.*, 2003), percussão (Noordan, 2002) e sinais transportados pelo ar (Edwards, 1981; Gwynne & Dadour, 1985; Maddison & Stratton, 1988). Nesta etapa do trabalho a atenção foi direcionada para avaliar a importância da comunicação acústica-vibracional transportada pelo ar e pelo substrato e sua relevância no comportamento sexual de *L. intermedia*. Este trabalho foi desenvolvido com a colaboração do Dr. Andrej Cokl, do Instituto Nacional de Biologia da Eslovênia, um dos maiores especialistas na área de comunicação acústica-vibracional de animais em nível mundial. Para o registro dos sinais vibratórios de *L. intermedia* transportados pelo substrato, machos e fêmeas foram colocados em uma arena sobre papel sulfite e os registros efetuados com o auxílio de um vibrômetro a laser, **Figura 33**.



Figura 33- Vibrômetro a laser utilizado para registrar os sinais estridulatórios e vibratórios.

Para o registro dos sinais vibratórios de *L. intermedia* transportados pelo ar utilizou-se um microfone de alta sensibilidade, **Figura 34**.



Figura 34- Microfone de alta sensibilidade.

Tanto os sinais transportados pelo substrato como os sinais transportados pelo ar foram registrados durante o cortejo e cópula de *L. intermedia*.

Antes de discutir os sinais acústicos-vibracionais registrados e sua importância no cortejo e cópula de *L. intermedia*, uma breve discussão sobre este tipo de estudo já realizados para aranhas do gênero e as etapas envolvidas no cortejo de *L. intermedia* serão apresentados.

IV.2.1- COMUNICAÇÃO ACÚSTICA-VIBRACIONAL EM ARANHAS DO GÊNERO *LOXOSCELES*

Três padrões motores são utilizados no cortejo de aranhas do gênero *Loxosceles*: 1- movimento e toque das pernas dianteiras, 2- pulsação abdominal e 3- vibração dos pedipalpos (*L. intermedia*: Fischer & Vasconcellos-Neto, 2000; *L. laeta*: Galiano, 1967; *L. Reclusa*: Hite *et al.*, 1966; Horner & Stewart, 1967; *L. gaúcho*: Rinaldi & Stropa 1998 e *L. hirsuta*: Fischer & Marques-da-Silva, 2001).

A variação destes elementos pode estar relacionado ao isolamento reprodutivo das espécies. O movimento das pernas dianteiras para o companheiro ocorre em ambos os sexos e em todas as espécies. A pulsação abdominal ocorre em machos e fêmeas de *L. reclusa* e *L. gaucho*, sendo observada na espécie *L. intermedia* somente nas fêmeas. Este padrão motor não foi observado para a espécie *L. laeta* e *L. hirsuta*.

A vibração dos pedipalpos ocorre em machos e em fêmeas de *L. intermedia*, *L. hirsuta* e *L. reclusa* e somente nos machos de *L. gaucho* e de *L. laeta*. Galiano (1967) foi o único autor a considerar a possibilidade de produção sonora durante a vibração dos pedipalpos. Uetz & Stratton (1982) classificaram a família Sicariidae com respeito à produção sonora realizada durante o friccionar das quelíceras de encontro aos pedipalpos. De acordo com Rinaldi & Stropa (1998), o mecanismo reprodutivo para o gênero *Loxosceles* depende da variação, da intensidade, da frequência e da duração do movimento dos pedipalpos, mas segundo os autores até hoje nada foi descrito quanto a registros sonográficos. A função do cortejo nas aranhas é fazer com que a fêmea incorpore um estado de akinesia, suprimindo seu comportamento predatório. De acordo com Foelix (1996), há três níveis do cortejo nos machos de aranhas. No primeiro, o contato direto é necessário; no segundo, os feromônios são necessários para estimular o macho e no terceiro, o reconhecimento visual é necessário. Muitas aranhas, tais como as do gênero *Loxosceles*, apresentam cortejo simples e curto, que envolve principalmente o movimento das pernas e dos pedipalpos. O friccionar dos palpos e o contato do macho na fêmea, assim como toques do palpo do macho na boca da fêmea, parecem ser um mecanismo importante para a akinesia na fêmea, além

de estimular a fêmea a elevar seu cefalotórax para que o macho possa assim posicionar-se abaixo dela para a inserção dos êmbolos. Este padrão motor foi registrado para *L. intermedia*, *L. reclusa*, *L. laeta* e *L. hirsuta* (Hite *et al.*, 1966; Horner & Stewart 1967; Galiano 1967; Fischer & Vasconcellos-Neto 2000; Fischer & Marques-da-Silva 2001). Entretanto para a espécie *L. intermedia* a pulsação abdominal parece ser o contexto mais importante na fase de akinesia, onde a fêmea exhibe este movimento somente após o toque do macho e o mantém durante todo o cortejo. O macho introduz os êmbolos na fêmea somente depois que a mesma para a pulsação abdominal, sugerindo uma relação entre este movimento e as informações sobre o grau de akinesia da fêmea.

IV.2.2- ETAPAS DO CORTEJO DE *L. intermedia*

As principais etapas no comportamento de cortejo da *L. intermedia* são ilustradas na **Figura 35** (Fischer e Vasconcellos-Neto, 2000).

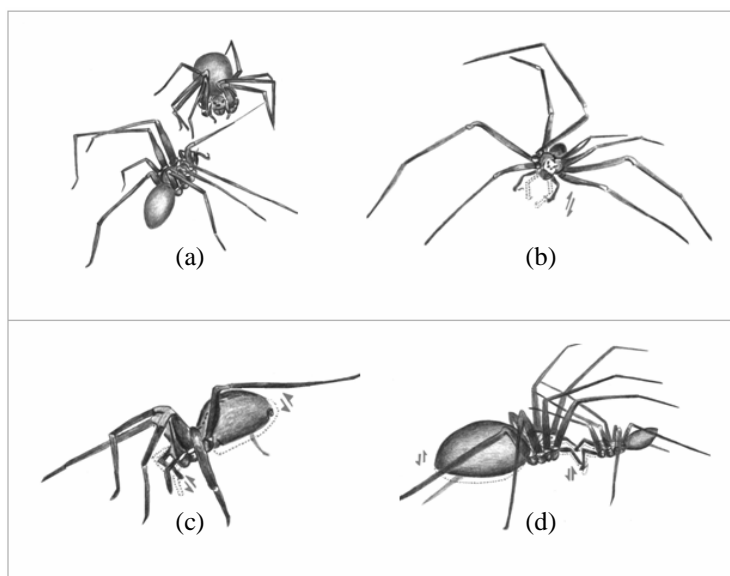


Figura 35- Padrões motores exibidos pela *L. intermedia* durante o cortejo: **(a)** Toque das pernas dianteiras; **(b)** Vibração dos pedipalpos dos machos; **(c)** Vibração dos pedipalpos das fêmeas e pulsação abdominal; **(d)** Vibrações simultâneas do pedipalpo e pulsações abdominais das fêmeas.

O cortejo é precedido pela localização e reconhecimento do parceiro que se dá pela movimentação e toque das pernas dianteiras no corpo do parceiro e pela manutenção dos pedipalpos estirados. Posteriormente os parceiros se aproximam e se tocam sucessivamente com suas pernas dianteiras. Ambos movem seus pedipalpos e a fêmea vibra seu abdômen. O macho se aproxima frontalmente, toca a ponta dos pedipalpos da fêmea com os seus e os vibram. A seguir, com

seus pedipalpos ainda vibrando ele os leva até a boca da fêmea, estimulando-a a levantar seu cefalotórax e posicionando-se abaixo dela. Tão logo a fêmea pare de vibrar seu abdômen o macho introduz seus pedipalpos nos receptáculos seminais.

O cortejo da *Loxosceles intermedia* é rápido (27,8 segundos) quando comparado com o de outras espécie (*L. hirsuta*: 40,9 segundos, seguido pela *L. gaucho* 1028 segundos) sendo esta última a menos agressiva em relações intraespecíficas no gênero *Loxosceles*.

IV.2.3- CARACTERÍSTICAS DOS SINAIS ACÚSTICOS-VIBRACIONAIS ENVOLVIDOS NO PROCESSO DE CÓPULA DA ESPÉCIE *L. intermedia*

Em aranhas da espécie *L. intermedia*, sinais de diferentes modalidades estão envolvidos durante o processo de cortejo e cópula. O som emitido pelas aranhas é produzido pela vibração dos pedipalpos e ocorre em todas as interações sexuais. Os sulcos estridulatórios na região retrolateral das quelíceras são friccionadas de encontro ao pino estridulador, produzindo sinais estridulatórios, os quais adquirem uma frequência dominante da escala componente transportada por via aérea ao redor de 770 hertz para fêmeas e de 170 hertz para machos. O nível de pressão acústica dos sinais estridulatórios encontram-se abaixo de 50 dB e valores da velocidade abaixo de 1 mm/s. A frequência de cópula não depende da presença dos pedipalpos nas fêmeas, entretanto, nos machos a remoção dos pedipalpos diminui a frequência de cortejo. A remoção dos pedipalpos dos machos diminui o desempenho de cópula e a adoção da postura de cópula. Durante o cortejo, as fêmeas vibram seus

abdômens após o toque pelo macho. A estridulação pode funcionar como um sinal do estado de akinesia porque precede a introdução dos êmbolos. A vibração do abdômen produz sinais tremulatórios de frequência dominante abaixo de 100 hertz, nível de pressão acústica abaixo de 60 dB e velocidade abaixo de 3 mm/s (Figura 36).

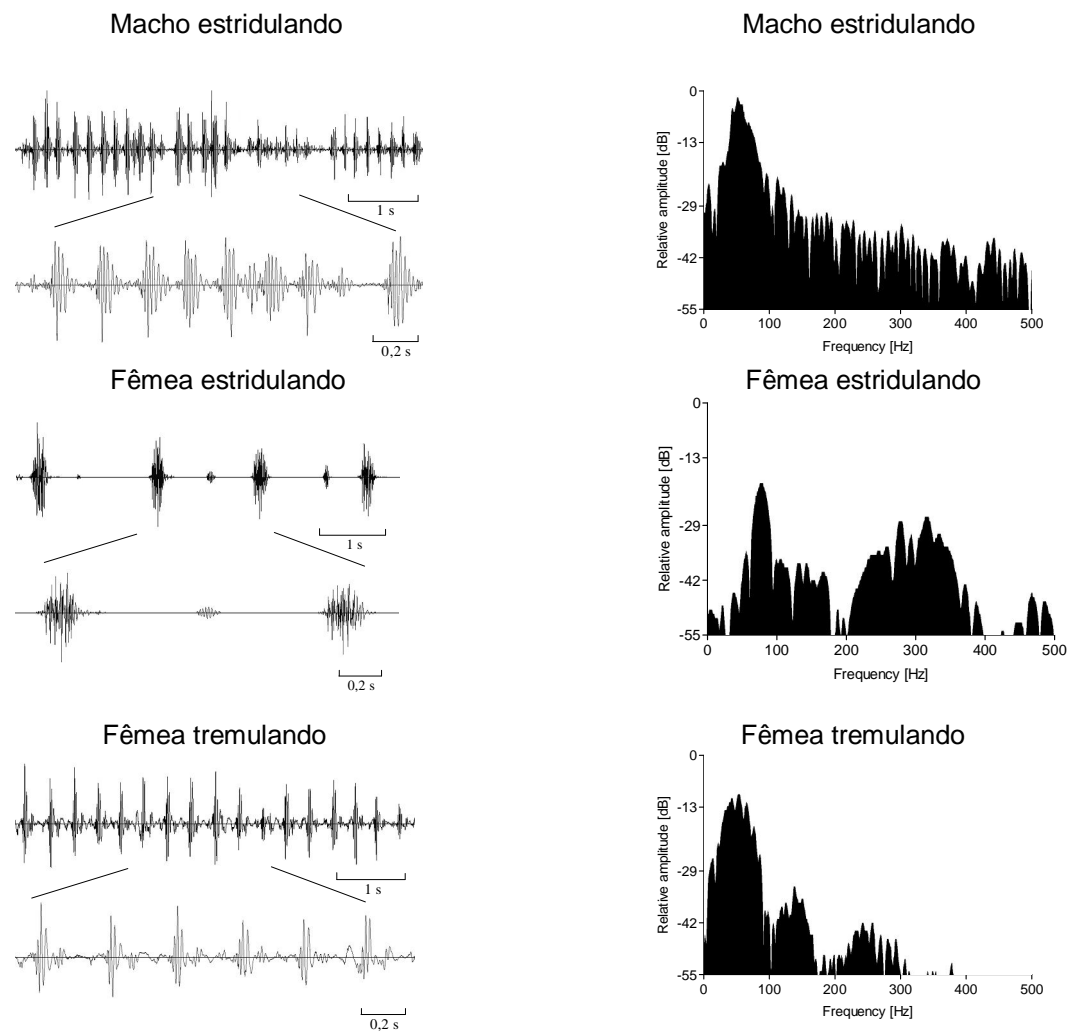


Figura 36- Apresenta o registro de oscilogramas (lado esquerdo) e espectros de frequência (lado direito).

Como descrito anteriormente, as fêmeas emitem sinais tremulatórios após o contato físico com um macho. Os pulsos são sinais únicos prontamente repetidos com características de maior ou menor amplitude. A diferença de velocidade entre eles varia de 7 a 11 dB. Nenhuma diferença significativa (NS, $P=0,0547$) para pulsos de amplitude mais elevada foi observado entre componentes transportados por via aérea e ruídos oriundos do substrato (**Tabela 9**). A frequência dominante dos componentes acústicos e vibratórios assim como sinais tremulatórios emitidos por todas as fêmeas testadas apresentaram-se abaixo de 100 hertz. A velocidade dos sinais gravados do substrato varia em torno de 1 mm/s, para pulsos de baixa amplitude e alcança valores de até 3 mm/s para aqueles de amplitudes mais elevadas. O nível médio de pressão sonora variou entre 30 e 58 dB (SPL), para pulsos gravados em distâncias relacionadas entre 1 e 5 cm da fonte.

Tabela 9- Valores médios de tempo (\pm SD, n/N) (duração e tempo dos pulsos para as repetições), frequência dominante, velocidade e nível da pressão sonora (SPL), características do substrato de transporte (S) e dos sinais tremulatórios e estridulatórios emitidos e transportados por via aérea por machos e fêmeas de *L. intermedia*.

		Sinais Tremulatórios		Sinais Estridulatórios	
		ampl. baixa	ampl. alta	Fêmea	Macho
Duração	S	102 \pm 23	106 \pm 22	244 \pm 93	124 \pm 28
		(n=200, N=8)	(n=27, N=3)	(n=35, N=3)	(n=50, N=5)
	A	53 \pm 17	119 \pm 40	74 \pm 29	82 \pm 39
		(n=103, N=6)	(n=58, N=3)	(n=122, N=7)	(n=174, N=9)
Repetição	S	249 \pm 38	930 \pm 161	467 \pm 154	272 \pm 134
		(n=154, N=5)	(n=35, N=3)	(n=17, N=3)	(n=60, N=6)
tempo (ms)	A	200 \pm 152	623 \pm 439	469 \pm 187	190 \pm 139
		(n=95, N=6)	(n=58, N=3)	(n=19, N=4)	(n=167, N=9)
Frequência	S	46 \pm 5	38 \pm 8	101 \pm 33	49 \pm 9
		(n=53, N=10)	(n=45, N=3)	(n=66, N=4)	(n=56, N=6)
dominante (Hz)	A	78 \pm 18	23 \pm 8	762 \pm 269	170 \pm 26
		(n=67, N=4)	(n=50, N=3)	(n=153, N=9)	(n=72, N=4)
Velocidade	S	1.00 \pm 0.34	0.38 \pm 0.03 -	0.07 \pm 0.03 -	0.48 \pm 0.12
		(n=60, N=3)	2.81 \pm 1.11	0.18 \pm 0.06	(n=74, N=4)
SPL	A	30 \pm 8	48 \pm 5	30 \pm 11	32 \pm 8
		43 \pm 4	58 \pm 5	(n=139, N=8)	43 \pm 8

As estruturas estridulatórias estão presentes nos machos e nas fêmeas, localizada na região retro e ventrolateral das quelíceras. Sulcos quase paralelos estão presentes principalmente nas margens internas e externas, e o pino estridulatório localiza-se na superfície ventrolateral do pedipalpo. Os sinais

estridulatórios foram produzidos em ambos os sexos pelo movimento ventro dorsal dos pedipalpos que causaram a fricção do pino estridulatório de encontro a sulcos retrolaterais das quelíceras. A **Figura 37** apresenta os sulcos estridulatórios nas regiões retro e ventro laterais assim como a pino estridulatório responsável pela estridulação.

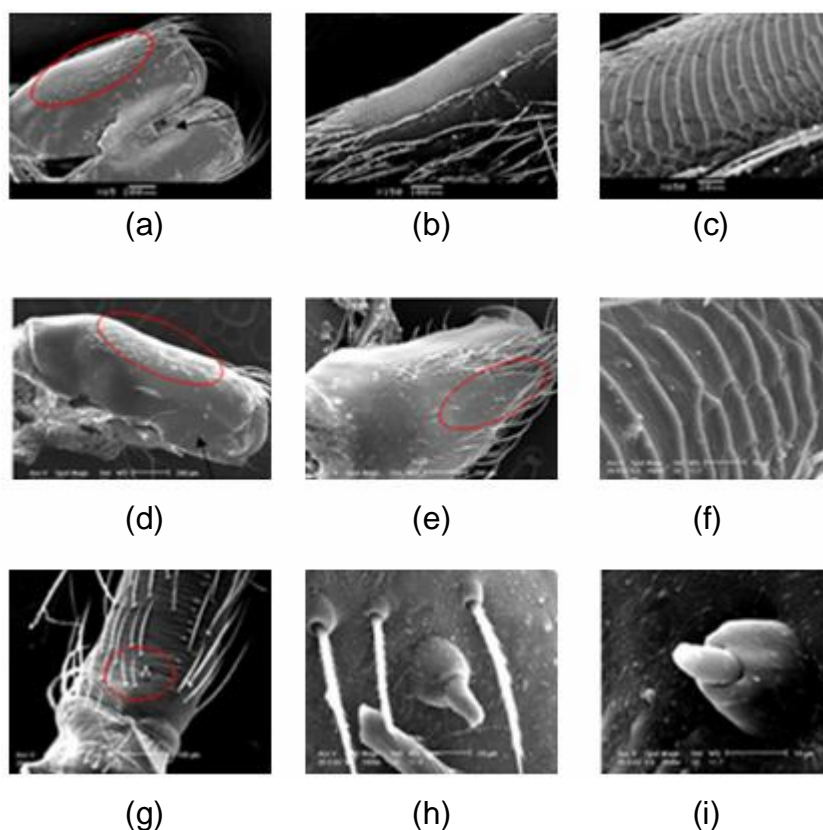


Figura 37- Micrografias **(a - c)** mostram a presença de sulcos estridulatórios no macho; as micrografias **(d - f)** mostram a presença de sulcos estridulatórios nas quelíceras das fêmeas de *L. intermedia*; e as micrografias **(g, h e i)** mostram o pino estridulatório localizado no pedipalpo de uma *L. intermedia* jovem.

Os machos produzem sinais estridulatórios na presença ou na ausência da estridulação da fêmea. Os valores expressos em velocidade dos sinais estridulatórios produzidos por machos são menores em comparação com os tremulatórios. Os sinais transportados por via aérea e aqueles sinais gerados no substrato são significativamente diferentes ($P < 0,01$).

Os sinais estridulatórios das fêmeas são provocados pelo contato dos pedipalpos dos machos, mas sua emissão nas fêmeas não depende da presença ou da ausência do macho estridulando seu pedipalpo. Os sinais estridulatórios das fêmeas foram emitidos em seqüências de únicos pulsos ou em uma combinação com os sinais tremulatórios.

Comparado com os sinais estridulatórios dos machos, os pulsos estridulatórios das fêmeas tiveram a menor velocidade e pressão sonora, com tempos mais elevados de repetição dos pulsos e com maiores valores dominantes de freqüência. Os sinais transportados por via aérea e aqueles sinais gerados no substrato são significativamente diferentes ($P < 0,01$) em sua duração e freqüência dominante; foram observados em escalas superiores a 500 hertz para os sinais gravados por via aérea e ao redor 100 hertz quando as gravações foram realizadas a partir do substrato.

Para avaliação do grau de importância dos sinais vibratórios no comportamento sexual foram realizados alguns experimentos: cópula na presença e ausência de teia; machos e fêmeas com pedipalpos intactos ou removidos; machos e fêmeas lavados ou não em acetona. Os resultados destes experimentos são discutidos a seguir.

As frequências de cortejo e cópula entre machos e fêmeas (intactos) não tratados ou tratados (lavados em acetona e/ou pedipalpos removidos) na presença ou a ausência de teia e são mostrados nas **Tabelas 10 e 11**. Nenhuma diferença significativa foi encontrada na frequência dos testes de cortejo na presença ou ausência de teia, mas a maioria das cópulas ocorreu na presença de teia ($\chi^2_1 = 5,2$; $P < 0,01$). O padrão de cópula foi o mesmo para indivíduos lavados e não lavados.

Para fêmeas não lavadas em acetona, o cortejo foi mais freqüente naquelas com pedipalpos do que aquelas sem o mesmo ($\chi^2_1 = 11,4$; $P < 0,01$); entretanto a frequência de cópula não dependeu de sua presença ou ausência. Para as fêmeas lavadas com acetona (com ou sem pedipalpos) ocorreu cortejo e cópula com frequência significativamente menor ($\chi^2_1 = 34$; $P < 0,01$ e $\chi^2_1 = 19,2$; $P < 0,01$).

Tabela 10- Frequência relativa do cortejo nas experiências com machos **(M)** e fêmeas **(F)** com pedipalpos **(wp)** e sem banho de acetona **(N)**, sem pedipalpo **(np)** e lavados com acetona **(B)**.

N = 10	Macho npN	Macho wpN	Macho npB	Macho wpB
Fêmea npN	50% (40%)	90% (40%)	0* (20%)*	10%* (10%)*
Fêmea wpN	90%* (50%)	60% (70%)	0* (40%)	30% (60%)
Fêmea npB	20% (0)*	50% (50%)	0* (0)*	10%* (20%)*
Fêmea wpB	30% (40%)	40% (60%)	0* (10%)*	50% (50%)

Os valores fora dos parênteses representam as interações realizadas na teia das fêmeas e nos parênteses às interações que ocorreram na ausência da teia. O número de interações com e

sem cópula foi comparada por meio do teste de Fisher, com as diferenças significativas sinalizadas com um asterisco (*).

A remoção dos pedipalpos diminuiu significativamente a frequência de cortejo de machos não lavados em acetona ($\chi^2_1 = 5,4$; $P < 0,01$). Por outro lado o desempenho copulatório ou adoção a uma postura de cópula ocorreu em uma frequência significativamente maior nos machos com os pedipalpos intactos comparados com os machos sem os mesmos ($\chi^2_1 = 9,6$; $P < 0,01$). Uma maioria significativa dos machos com ou sem pedipalpos quando lavados em acetona não cortejaram ou copularam ($\chi^2_1 = 47$; $P < 0,01$ e $\chi^2_1 = 28,7$; $P < 0,01$).

Tabela 11: Frequência relativa de cópula ou adoção de postura de copula em experimentos com machos **(M)** e fêmeas **(F)** com pedipalpos **(wp)** sem banho de acetona **(N)**, sem pedipalpo **(np)** e lavados com acetona **(B)**.

N = 10	Macho npN	Macho wpN	Macho npB	Macho wpB
Fêmea npN	50% (30%)	90%* (30%)	0* (20%)*	10%* (10%)*
Fêmea wpN	90%* (30%)	60% (60%)	0* (20%)*	10%*(0)*
Fêmea npB	0* (0)*	30% (10%)*	0* (0)*	0* (10%)*
Fêmea wpB	30% (40%)	40% (0)*	0*(0)*	30% (0)*

Os valores fora dos parênteses representam as interações realizadas na teia das fêmeas e nos parênteses às interações que ocorreram na ausência da mesma. O número das interações com e sem copulação foi comparada por meio do teste de Fisher, com as diferenças significativas sinalizadas com um asterisco (*).

A lavagem de um macho ou de uma fêmea com acetona diminuiu significativamente a frequência de cópula ($\chi^2_1 = 17,7$; $P < 0,01$ e $\chi^2_1 = 31,0$; $P < 0,01$).

As fêmeas atacaram e mataram os machos em 26 interações, em 73% dos casos o macho tinha sido lavado com acetona ($\chi^2_1 = 5,5$; $P < 0,01$). Entretanto, não houve nenhuma diferença significativa no número das interações que conduziram à morte de machos na presença de teia (53%) ou na ausência da mesma (47%).

IV.3- AVALIAÇÃO PRELIMINAR COMPORTAMENTAL E DE TOXICIDADE DE COMPOSTOS SELECIONADOS PARA O CONTROLE DA ARANHA-MARROM

IV.3.1- AVALIAÇÃO PRELIMINAR DE TOXICIDADE DOS COMPOSTOS

Na tentativa de combater a aranha-marrom a população de Curitiba utiliza alguns produtos como “repelentes”, relatados como produtos que “afugentam” as aranhas, sendo que nenhum trabalho sistemático foi desenvolvido até o momento para avaliar a eficiência dos mesmos. Os produtos empregados neste experimento foram selecionados após pesquisa efetuada com a população de Curitiba e região metropolitana. Estes compostos foram adquiridos em lojas especializadas do comércio local e utilizados sem prévia purificação. Entre os produtos testados um deles será identificado como sendo XY tendo em vista que um pedido de patente está sendo redigido e a identidade dos compostos tem que ser preservada. Desta forma XY é um produto comercial que apresenta os compostos X e Y como componentes majoritários. O primeiro teste efetuado foi para avaliar a mortalidade

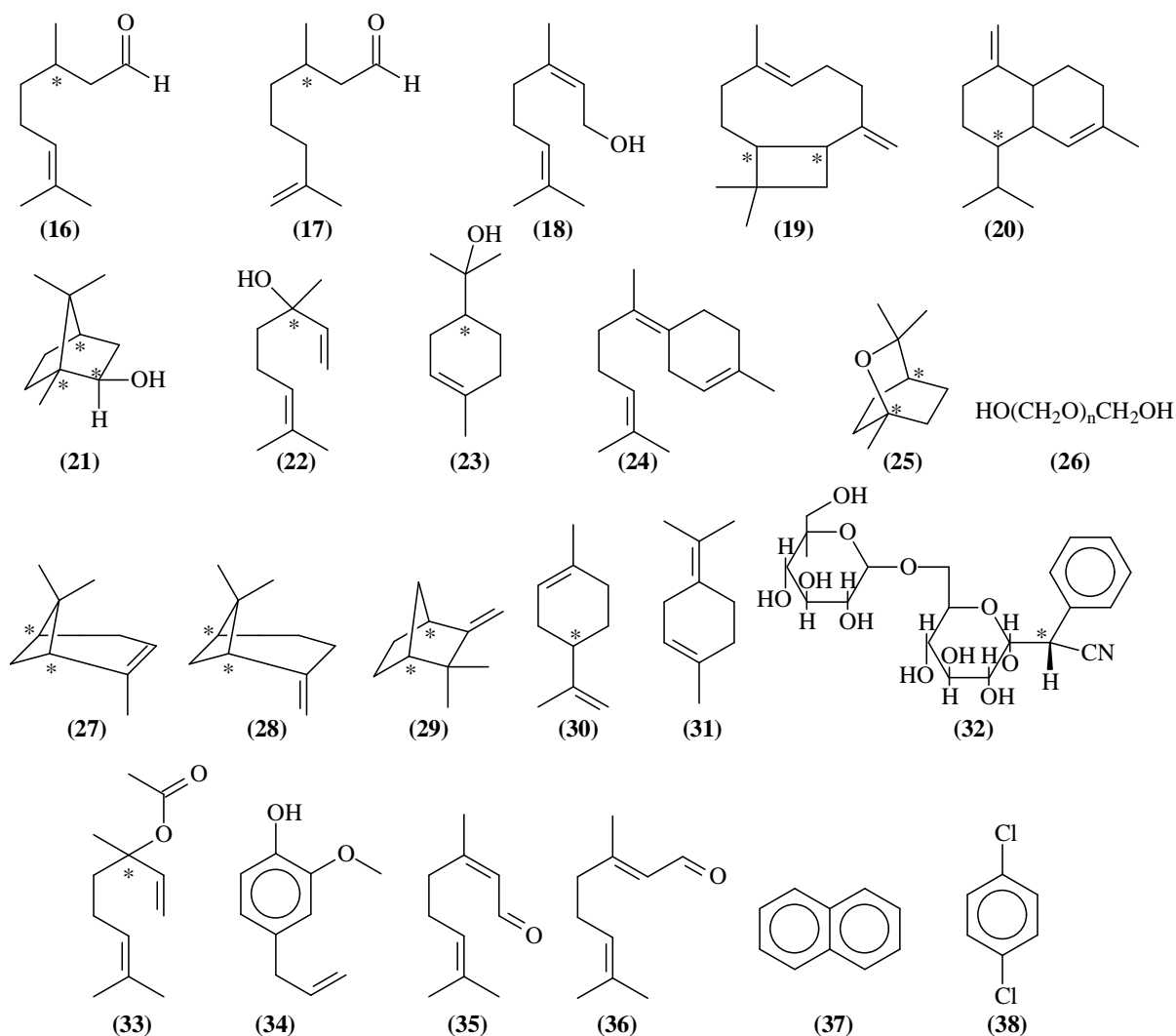
que estes compostos causavam na aranha-marrom. Os resultados dos testes da ação dos compostos selecionados sobre os indivíduos de *L. intermedia* estão listados na Tabela 12.

Tabela 12- Mortalidade de indivíduos de *L. intermedia* (N=4 para cada experimento) expostos a diferentes produtos em potes plásticos de 500 mL, 24, 48 e 96 h após a introdução dos indivíduos.

Temperatura °C	Produto testado	Principais componentes	Mortalidade		
			24 h	48 h	96 h
24	Citronella	(16);(17);(18)	0	0	0
24	Cânfora	(19);(20);(21);(22);(23);(24);(25)	1	1	2
24	Paraformol	(26)	0	0	0
24	Eucaliptol	(16);(17);(25)	1	1	1
19	Óleo de Pinho	(23);(27);(28);(29);(30);(31)	0	0	1
19	Amêndoa amarga	(32)	0	0	1
19	Bergamota	(18);(22);(30);(33)	0	0	0
20	Óleo de cravo	(34)	0	0	0
20	Capim limão	(35);(36)	1	1	1
25	Naftalina	(37)	0	0	3
25	<i>p</i> - dicloro-benzeno	(38)	4	4	4
25	Varsol	*	0	2	2
25	Querosene	*	0	0	0
20	Produto XY		3	3	3
25	Composto X		0	0	0
25	Composto Y		0	2	2

* Mistura de hidrocarbonetos com cadeia carbônica variando entre C₉-C₁₆.

A **Figura 38** apresenta as estruturas dos principais componentes presentes nos produtos testados.



* indica a localização do estereocentro

Figura 38- Principais constituintes dos produtos utilizados nos experimentos de repelência.

Citronella, paraformol, bergamota, óleo de cravo e o composto X não causaram mortalidade nas aranhas expostas. Óleo de pinho e amêndoa amarga não causaram mortalidade nas primeiras 24 horas, apenas um dos quatro indivíduos expostos a cada uma das substâncias morreu após 96 horas de exposição. Para eucaliptol e capim limão, apenas um dos indivíduos de cada grupo foi encontrado morto após 24 e 96 horas de exposição ao produto. Cânfora causou mortalidade de 1 indivíduo após 24 horas e de 2 indivíduos após 96 horas. Varsol e o composto Y, causaram a mortalidade de 2 indivíduos após 48 horas, já o querosene não causou a mortalidade de nenhum indivíduo após 48 horas. As substâncias que causaram mortalidade de mais de 2 indivíduos foram: Produto XY, naftalina e *p*-dicloro benzeno (PDB). O PDB foi a única substância que causou a morte de todos os indivíduos já nas primeiras 24 horas de experimento.

IV.3.2- TESTE DE REPELÊNCIA/EFEITO DESALOJANTE SOBRE A ARANHA-MARROM

Dos produtos testados no experimento de mortalidade aqueles que apresentaram mortalidade após 96 h igual ou superior a 50% das aranhas tiveram suas ações avaliadas como possíveis repelentes, exceção do composto X e do querosene. O querosene foi avaliado neste teste por aparecer em todas as pesquisas feitas junto à população como um possível repelente e o composto X, teve sua ação avaliada por ser um dos componentes majoritários do produto XY.

Nada está descrito em literatura sobre a avaliação de possíveis repelentes de aranhas. Neste sentido um procedimento foi planejado respeitando o

comportamento da *L. intermedia*, ou seja, seu hábito noturno e sua tendência de buscar abrigo quando exposta à luz direta. Desta forma os testes para avaliar a ação repelente dos produtos foram realizados em arena confeccionada em tubo de PVC com três aberturas para caixas de fósforos, excelentes substratos para a aranha-marrom. Em duas das aberturas eram colocadas as substâncias a serem avaliadas. Sob a arena incidia luz o que forçava a aranha a buscar refúgio nas caixas de fósforo.

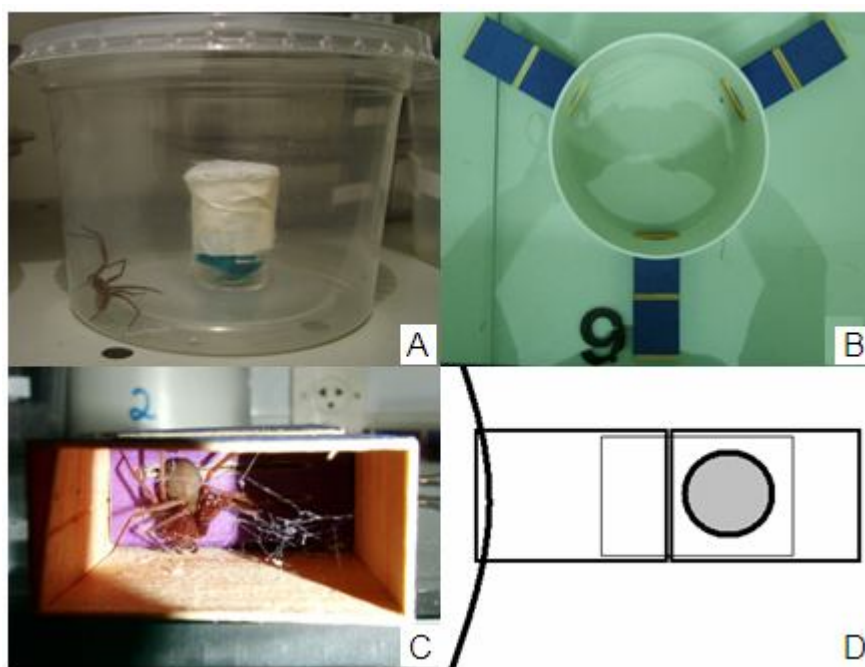


Figura 39- Imagens dos experimentos: (a) *L. intermedia* no pote para experimento de avaliação preliminar comportamental e de toxicidade dos compostos; (b) Arena para teste de repelência-efeito desalojante dos compostos selecionados; (c) Aranha no interior de caixa de fósforos utilizada no teste de repelência-efeito desalojante; (d) Esquema mostrando montagem das caixas de fósforo utilizadas no teste de repelência-efeito desalojante dos compostos selecionados.

A caixa de fósforos que não continha nenhum produto foi sistematicamente chamada de caixa 1. As aranhas podiam portanto, após decorrido o período estabelecido, se alojarem nas caixas 1, 2, 3 ou em nenhuma delas, o que foi determinado de arena. Entre 20 e 24 aranhas foram testadas em cada experimento, com exceção do composto XD, o qual foi testado apenas com 17 aranhas.

A Tabela 13, apresenta os resultados obtidos nos experimentos de repelência/efeito desalojante sobre a aranha-marrom.

Tabela 13- Resultados dos experimentos para avaliar a ação repelente com arena. χ^2 , $P < 0,05$; χ^2 , $P < 0,01$; χ^2 , $P < 0,001$.

Tratamento	Número de aranhas utilizadas	Localização da aranha após 60 min			Localização da aranha após 24 h		
		caixa 1	caixa 2 ou 3	arena	caixa 1	caixa 2 ou 3	arena
Controle	24	10	13	1	9	15	-
Cânfora**	24	16	8	-	14	10	-
Naftalina**	24	14	6	4	20	4	-
PDB**	24	19	5	-	18	6	-
Varsol*	20	11	9	-	12	8	-
Querosene**	20	11	8	1	13	7	-
Produto XY***	24	16	7	1	18	6	-
Composto X***	24	14	9	1	21	3	-
Composto Y***	20	18	2	-	19	1	-
Produto YD***	20	-	-	-	20	0	-
Produto XD**	17	-	-	-	14	3	-

As aranhas escolheram de forma aleatória os refúgios disponíveis na arena quando nenhuma substância repelente estava presente nas caixas ($\chi^2 = 0,19$ $P < 0,66$). Normalmente as aranhas permaneciam na primeira caixa escolhida.

Dentre os compostos testados, o varsol ($\chi^2 = 6,30$; $P < 0,01$), o querosene ($\chi^2 = 8,90$; $P < 0,002$), e a cânfora ($\chi^2 = 6,75$; $P < 0,009$), apresentaram os menores efeitos repelente. Por outro lado a naftalina ($\chi^2 = 27,00$; $P < 0,001$), composto X ($\chi^2 = 31,68$; $P < 0,001$), composto Y ($\chi^2 = 35,35$; $P < 0,001$), PDB ($\chi^2 = 18,75$; $P < 0,001$), e produto XY ($\chi^2 = 18,75$; $P < 0,001$) mostraram efeito repelente significativo.

Embora o resultado de repelência do PDB tenha sido bom, cabe ressaltar que, por se tratar de um orgão clorado sua utilização deva ser evitada em ambientes domiciliares, pois pode apresentar ação cancerígena quando da exposição direta.

Uma das alternativas ao emprego de PDB seria a utilização do produto XY tendo em vista ter apresentado um excelente efeito repelente-desalojante aliado ao fato de não ser tóxico ao ser humano. Com base nestes resultados o efeito dos componentes majoritários deste produto, compostos X e Y também foram avaliados, os quais mostraram excelente efeito repelente-desalojante.

Dois outros compostos foram sintetizados em laboratório, um derivado do composto X e denominado de XD e outro derivado do composto Y e denominado YD. A atividade de ambos os compostos foram avaliadas, XD ($\chi^2 = 7,118$; $P = 0,0076$) e YD ($\chi^2 = 18,75$; $P < 0,001$), apresentando-se este último com 100 % de efeito repelente.

O resultado deste experimento é bastante importante no contexto geral do trabalho proposto, pois além de não haver em literatura nenhuma descrição sobre estudos de repelentes-desalojantes sobre aranhas abre-se a possibilidade de se explorar substâncias com baixa toxicidade ao ser humano como importante ferramenta no manejo integrado desta importante praga urbana.

IV.4- AVALIAÇÃO DA SUSCEPTIBILIDADE DE *Loxosceles intermedia* A PESTICIDAS PIRETRÓIDES

IV.4.1- PIRETRÓIDES COMO INSETICIDAS

Desde os primórdios da civilização os insetos e pragas urbanas têm-se constituído um dos mais sérios problemas para o homem. O controle químico para combater agentes biológicos prejudiciais à agropecuária e a saúde pública foi um dos primeiros a ser utilizado e continua até hoje. Um inseticida conhecido desde o primeiro século da era cristã, era o piretro (Decis[®]), extraído das flores de *Chrysanthemum cinerariaefolium*. Até a II Guerra Mundial, o piretro, a rotenona e a nicotina eram os principais produtos de origem vegetal utilizados no controle de pragas. As descobertas dos inseticidas DDT em 1939 (West & Campbell, 1946) e do herbicida 2,4-D em 1942 (Zimmerman & Hitchcock, 1942), causaram uma revolução, abrindo perspectivas para a possibilidade de se sintetizar compostos para o controle de pragas. Entretanto, em 1962 surgiu a publicação “Silent Spring”, (Carson, 1962), que criticava os pesticidas sintéticos e recomendava o uso de

piretro, por ser um inseticida natural, praticamente atóxico para o homem e com baixo potencial para causar contaminação ambiental. Pode-se dizer que a sua obra foi o marco da história moderna do piretro, contribuindo para a retomada do interesse por esse inseticida natural.

O piretro de uso comercial, *Chrysanthemum cinerariaefolium*, pertence a família das Asteraceae. O uso de suas flores para a extração de inseticidas originou-se na Pérsia, hoje Irã, onde o pó de piretro era conhecido como pó da Pérsia. Atualmente, existem grandes áreas de seu cultivo em regiões de altas altitudes como Quênia, Tanzânia e Equador. No Brasil as áreas de cultivo situam-se nas regiões do extremo sul.

IV.4.2- PIRETRINAS NATURAIS

O extrato de piretro, uma vez livre de pigmentos, é denominado piretrina (Gnadinger, 1936). Os seus componentes inseticidas, conhecidos por piretrinas ou piretróides (Gunther & Jeppson, 1960), são ésteres dos ácidos crisantêmico **(39)** e pirétrico **(40)** com os álcoois piretrolona **(41)**, cinerolona **(42)** e jasmolona **(43)** (ciclopentenolonas), **Figura 40**.

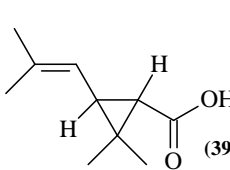
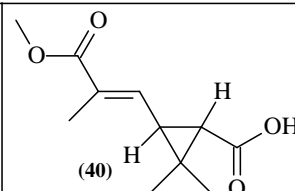
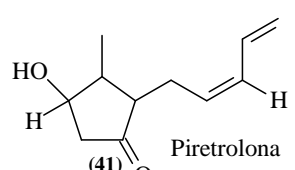
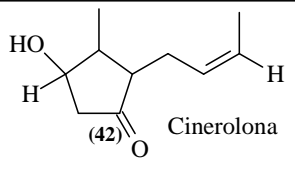
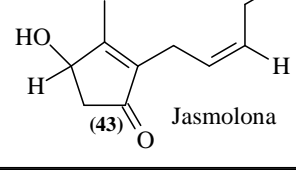
<div>Ácido</div> <div>Cetoálcool</div>	 <div>Ácido crisantêmico (39)</div>	 <div>Ácido pirétrico (40)</div>
 <div>Piretrolona (41)</div>	Piretrina I	Piretrina II
 <div>Cinerolona (42)</div>	Cinerina I	Cinerina II
 <div>Jasmolona (43)</div>	Jasmolina I	Jasmolina II

Figura 40- Ácidos e álcoois utilizados na síntese de compostos crisantêmicos.

Os crisantematos compreendem a piretrina I, a cinerina I e a jasmolina I e formam a fração piretrina I enquanto que a piretrina II, a cinerina II e a jasmolina II são piretratos e pertencem à fração piretrina II (Head, 1973). As estruturas químicas desses seis ésteres são mostradas na **Figura 41**.

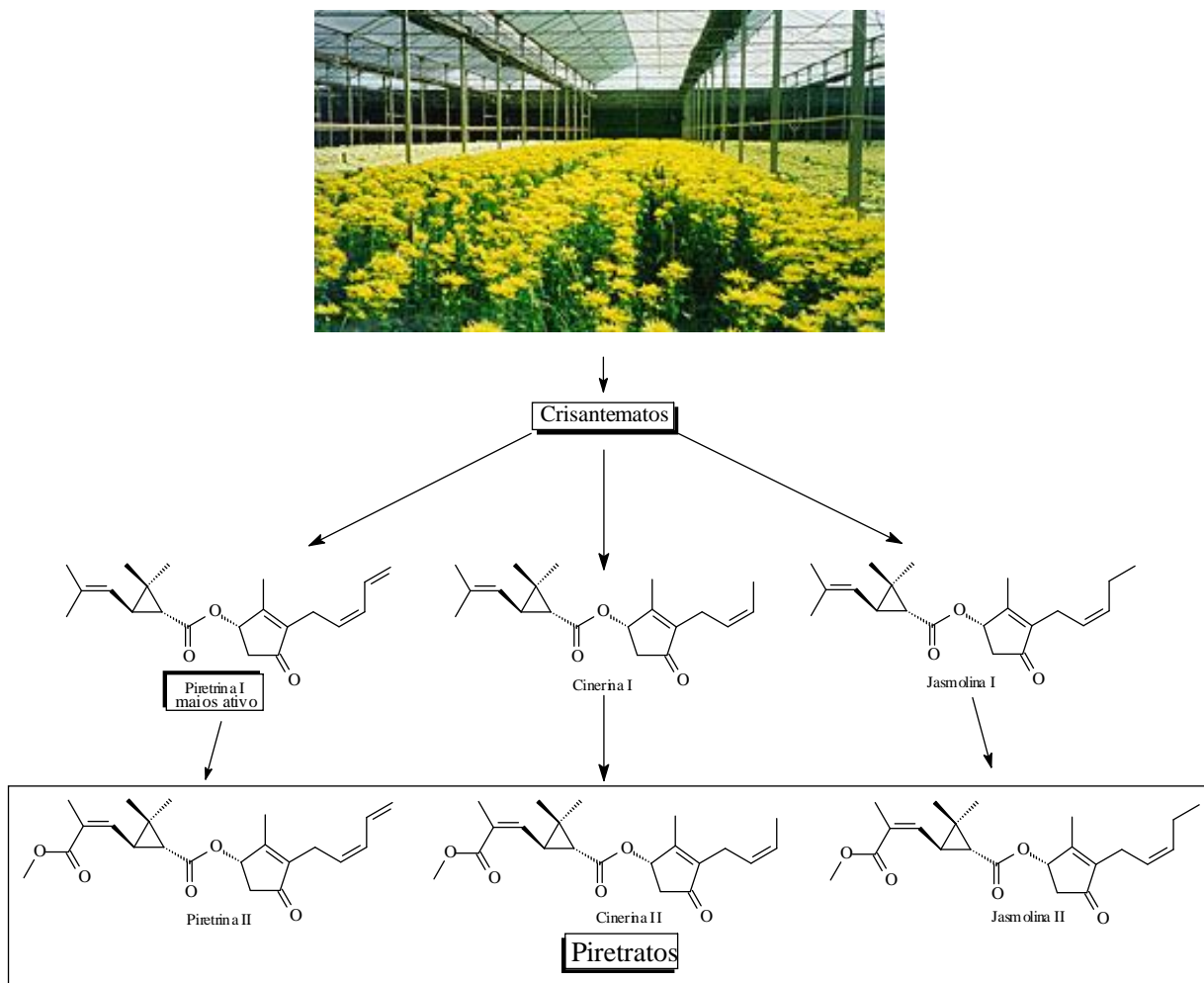


Figura 41 - Estruturas dos constituintes do extrato de piretro.

Embora sejam conhecidas cerca de 2000 espécies de plantas com propriedades inseticidas, comercialmente somente algumas como aquelas contendo piretrinas, rotenona ou nicotina, foram usadas como fonte de inseticidas (Balandrin, *et al.*, 1985). Do ponto de vista econômico, o mais importante dos

produtos vegetais empregados no controle dos insetos foram as piretrinas, devido as suas propriedades tais como: amplo espectro de atividade, ação rápida e eficiente em baixas doses, baixa toxicidade frente a mamíferos por rotas normais de aplicação e baixo poder residual.

Na planta, os piretróides são estabilizados por anti-oxidantes como o ácido gálico **(44)** e a hidroquinona **(45)** (**Figura 42**) (Galeffi & Marine, 1988), porem são instáveis ao ar e à luz, o que limita sua utilização no combate a pragas de campo.

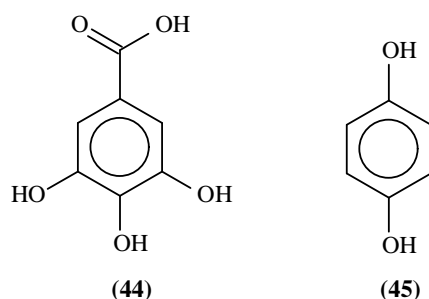


Figura 42 - Estruturas do ácido gálico **(44)** e da hidroquinona **(45)**, anti-oxidantes naturais presentes nos extratos de *Chrysanthemum cinerariaefolium*.

IV.4.3- PIRETRÓIDES SINTÉTICOS

Os piretróides sintéticos foram descobertos através de intensas pesquisas envolvendo a bioatividade da piretrina I, o mais ativo constituinte do extrato do piretro. O fato das moléculas serem constituídas por duas subunidades estruturais, uma ácida e outra alcoólica, tem possibilitado a elaboração de sínteses menos complicadas do que àquelas envolvendo moléculas complexas. Um exemplo desta última é a síntese da azadiractina A **(46)** (**Figura 43**), um potente inseticida natural que, no entanto não serviu como protótipo para o planejamento de derivados

sintéticos devido às dificuldades para elaboração de sínteses economicamente viáveis (Isman *et al.*, 1990)

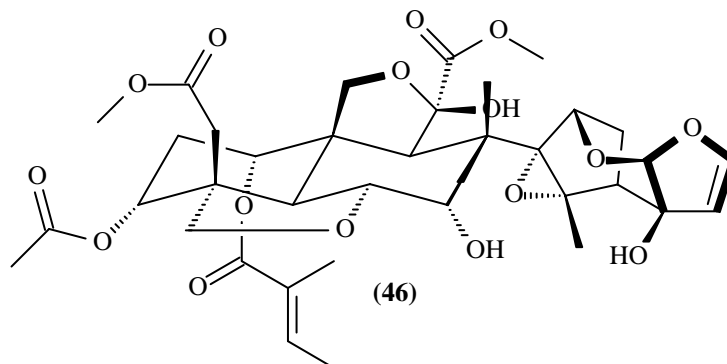


Figura 43- Estrutura do isômero A da azadiractina A, um potente inseticida natural.

O propósito da síntese de piretróides sintéticos almejava aumentar a atividade dos compostos naturais bem como atingir uma fotoestabilidade satisfatória.

IV.4.3.1- PIRETRÓIDES SINTÉTICOS FOTOLÁBEIS

Um passo significativo no estudo dos piretróides sintéticos foi a síntese do ácido crisantêmico por Campbell e Harper (1945), porém, o primeiro grande avanço neste campo foi as versáteis preparações de ciclopentenolonas conduzidas por Schechter (1949), que obteve a aletrina A **(47)**, **Figura 44**.

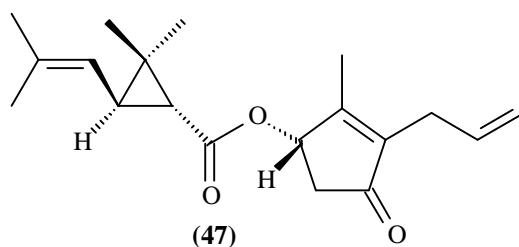


Figura 44- Isômero mais ativo da aletrina A, primeiro piretróide sintético comercialmente importante.

A aletrina obtida através de rotas clássicas em Química Orgânica gera uma mistura de oito estereoisômeros com diferentes graus de atividade inseticida. A aletrina é instável ao ar e à luz, porém são mais estáveis a esses agentes que as piretrinas naturais. Outro piretróide, obtido por Elliott (1967), foi a resmetrina **(48)**, que como a aletrina é também instável ao ar e à luz, **Figura 45**.

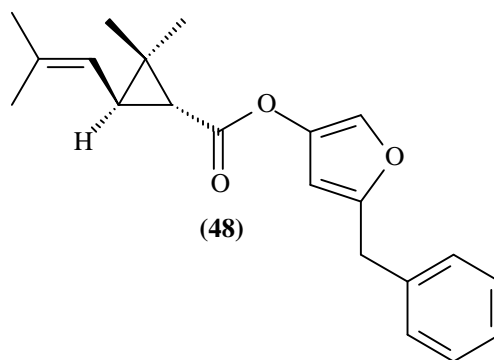


Figura 45- Bioresmetrina, isômero mais ativo da resmetrina.

Em 1969, Itava sintetizou a fenotrina **(49)** (**Figura 46**). A d-fenotrina, é moderadamente estável ao ar e instável à luz, porém mais resistente à fotólise que a piretrina I, aletrina e resmetrina.

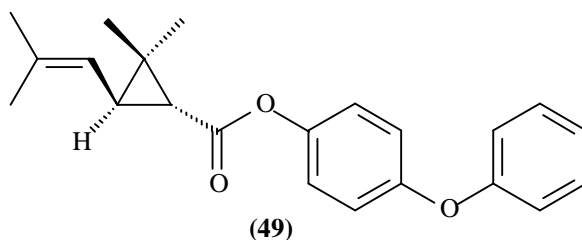


Figura 46- Isômero mais ativo da fenotrina.

A introdução do grupo 3-fenoxibenzílico na subunidade estrutural alcoólica na molécula da fenotrina proporcionou uma estabilização superior às modificações feitas até então na estrutura da piretrina I. Sua síntese foi um marco importante no desenvolvimento dos piretróides, contribuindo para o início da era dos piretróides fotoestáveis. (Mizumoto & Sumimoto, 1988).

IV.4.3.2- PIRETRÓIDES SINTÉTICOS FOTOESTÁVEIS

A permetrina apresentada na **Figura 47**, foi o primeiro piretróide desenvolvido com adequada estabilidade à luz, foi sintetizado por Elliott, em 1973. A rápida evolução desta classe de piretróides deve-se à descoberta de que eles eram cerca de dez vezes mais eficientes contra larvas de lepidópteros que os mais potentes inseticidas organoclorados, organofosforados e carbamatos até então conhecidos (Elliott, 1973).

A fotoestabilidade da permetrina (**50**) é cerca de dez a cem vezes maior que a dos piretróides não halogenados (**Figura 47**).

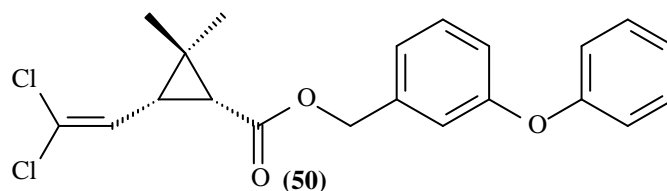


Figura 47- Estereoisômero mais estável da permetrina.

Um notável piretróide fotoestável obtido por Elliott (1974), foi a deltametrina (**51**) (**Figura 48**), sendo esta cerca de dez vezes mais potente que a permetrina, sendo hoje um dos piretróides mais utilizados no combate de pragas urbanas.

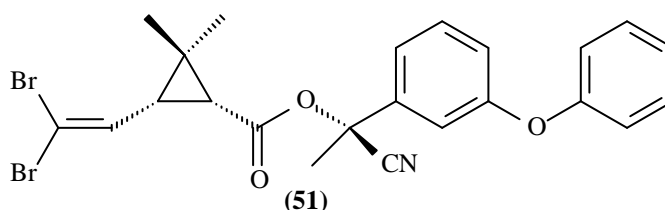


Figura 48- Estrutura da deltrametrina (3-(2,2-dibromovinil)-2,2-dimetil-ciclopropanocarboxilato de α -ciano-3-fenoxibenzila).

IV.4.4- RELAÇÃO ESTRUTURA-ATIVIDADE EM PIRETRÓIDES

Atualmente é reconhecido que o progresso na compreensão das relações estrutura-atividade nos piretróides, depende muito mais das comparações entre as atividades biológicas dos constituintes individuais de misturas inseticidas do que entre as misturas inseticidas individuais, Elliott (1979). Esta observação é oportuna se considerarmos que numa mistura piretroidal como a aletrina, pode haver uma diferença de até cem vezes na atividade biológica entre os seus isômeros. Ainda, a atividade inseticida individual dos componentes da mistura pode manifestar-se de diferentes maneiras, como ocorre nas piretrinas, onde a piretrina II é responsável pelo “Knock-down”, enquanto a piretrina I é a que causa a morte propriamente dita.

Um grande número de dados experimentais mostra que nos inseticidas organofosforados (Eto, 1974) e carbamatos (Kuhr & Dorrough 1976), a presença de grupos doadores ou receptores de elétrons em suas moléculas tem uma influência

na atividade inseticida. Entretanto, nenhuma correlação significativa deste tipo é mencionada em relação aos piretróides (Elliott & Janes 1979).

Assim para a alta atividade nos crisantematos, a configuração do C-1 do anel ciclopropânico deve ser (*R*), e as configurações do C-1, e C- α , respectivamente da subunidade estrutural ciclo-pentenolônica e α -ciano-3-fenoxibenzilica, devem ser (*S*) (**Figura 49**).

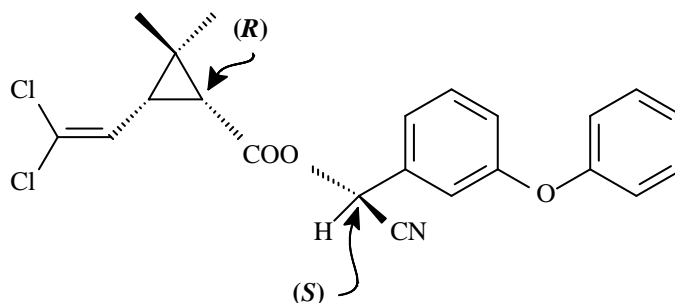


Figura 49- Configurações dos centros quirais em moléculas de piretróides ativos.

V.4.5- PESTICIDAS NO CONTROLE DE ARANHAS

O controle de aracnídeos na atualidade é principalmente efetuado com compostos com ação pesticida, tendo poucos trabalhos publicados que indiquem quais destes seriam os mais apropriados em um contexto ambiental. Particularmente os registros da ação de pesticidas avaliados sobre *Loxosceles* são insipientes e antigos como o trabalho desenvolvido por Wingo (1964) que indicou que a mistura de 2% de DDT (**Figura 50a**) e 2% de Chlordane (**Figura 50b**) apresentava-se efetiva na diminuição populacional. Nesse mesmo trabalho também se indica o lindane (**Figura 50c**) como o pesticida adequado para áreas infestadas com *L. reclusa* a uma concentração letal de 85 µg/g (CL₅₀). Hite *et al.* (1966) analisou 13 pesticidas aplicados diretamente no corpo de *L. reclusa*, sendo descrito a seguinte ordem de efetividade: General Chemical 3707 (CL₅₀ = 3,9 µg/g), lindane (CL₅₀ = 13,2 µg/g do inseto), trithion (CL₅₀ = 19,0 µg/g do inseto), diazinon (CL₅₀ = 34,0 µg/g do inseto), entex (CL₅₀ = 64,0 µg/g do inseto), heptachlor (CL₅₀ = 74,0 µg/g do inseto), chlordane (CL₅₀ = 93,0 µg/g do inseto), pyrethrum (CL₅₀ = 104,0 µg/g do inseto), malathion (CL₅₀ = 109,0 µg/g do inseto), bayer 39007 (CL₅₀ = 128,0 µg/g do inseto), tedion (CL₅₀ = 403,0 µg/g do inseto), DDT (CL₅₀ = 2716,0 µg/g do inseto) e sevin (CL₅₀ = 6192,0 µg/g do inseto). Dentre estes, Hite *et al.* (1966), selecionou o lindane como o de melhor desempenho.

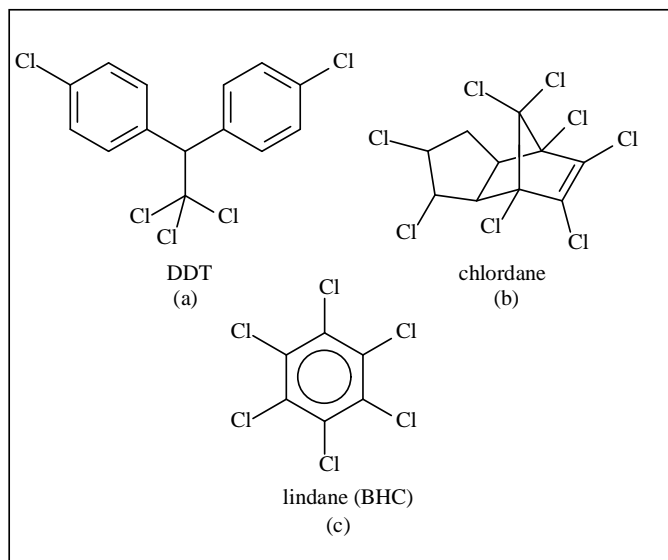


Figura 50- Princípios ativos: **(a)** DDT; **(b)** Chlordane; **(c)** Lindane.

Posteriormente, Norment e Pate (1968) analisaram a atividade residual do lindane e diazinon utilizando papel filtro como substrato no teste com *L. reclusa*. Os produtos em grau técnico foram diluídos a 1%. Nesta concentração o lindane apresentou um efeito residual até por uma semana, e o diazinon por período inferior. Levi e Spielman (1968) avaliaram a mortalidade de *L. laeta* com papel filtro impregnado com os pesticidas DDT (4%), dieldrin (1,6%), lindane (0,5%), chlordane (4%) e misturas diluídas dos mesmos produtos, selecionando como os melhores lindane e chlordane. Gladney e Dawkins (1972) avaliaram os pesticidas resmethrin, dichlorvos, methoxychlor e ronnel mediante aplicação direta no dorso em *L. reclusa*. Apenas o primeiro produto apresentou menor concentração letal a 50%, sendo sua $CL_{50} = 14,2 \mu\text{g/g}$ inferior quando comparada a dos outros três inseticidas ($CL_{50} = 442,4 \mu\text{g/g}$, $CL_{50} = > 1600 \mu\text{g/g}$ e $CL_{50} = > 3000 \mu\text{g/g}$). Devido a

este fato os outros inseticidas foram classificados como inviáveis para o controle de *L. reclusa*.

Tendo em vista a variabilidade metodológica verificada nos trabalhos envolvendo a avaliação de pesticidas frente ao gênero *Loxosceles*, às diferenças encontradas nas concentrações letais, o reconhecimento atual dos efeitos cancerígenos de alguns dos produtos avaliados em trabalhos anteriores (Sandidge & Hopwood, 2005) teve-se como objetivo, nesta etapa, a avaliação da susceptibilidade aos piretróides de amplo espectro de ação: Demand 2,5 CS, Icon 5 CS, K-Othrine CE 25, e Cymperator 25 CE, utilizados atualmente no controle populacional de *L. intermedia* **Figura 51**.

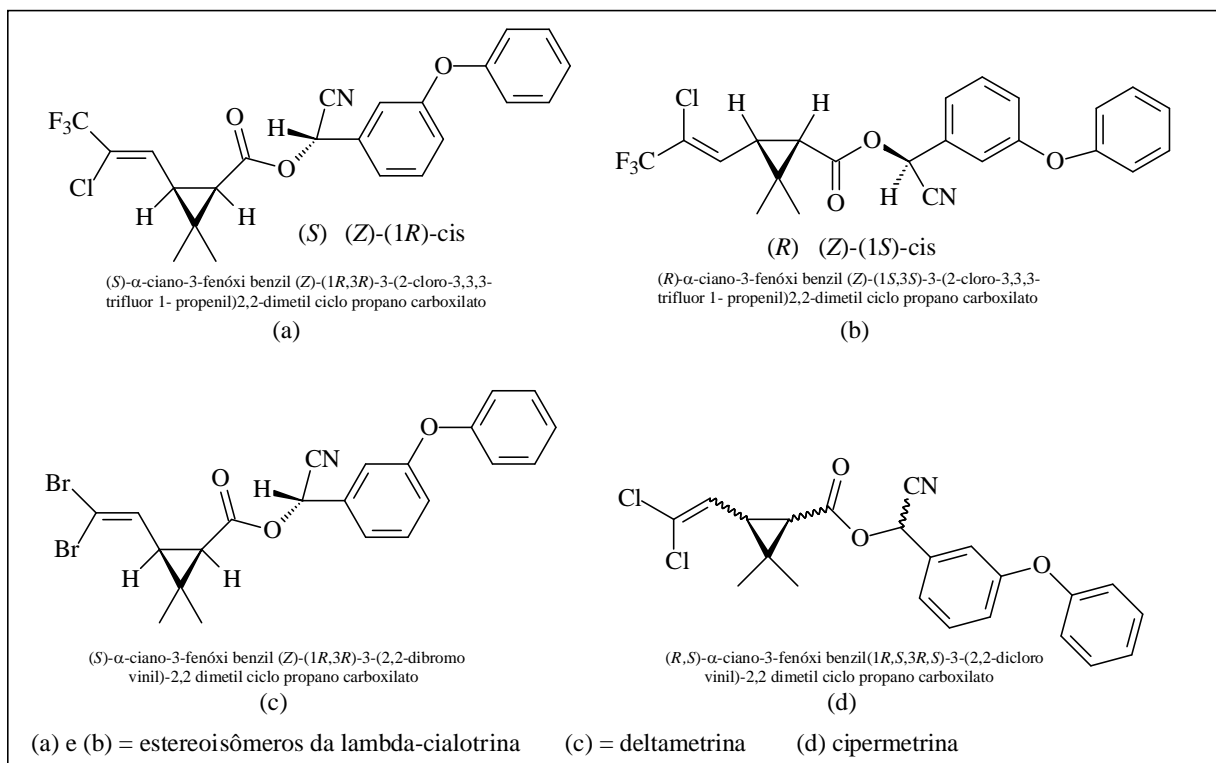


Figura 51 - Estrutura química dos princípios ativos dos piretróides utilizados nos experimentos. Compostos **(a)** e **(b)**, mistura dos estereoisômeros da lambda-cialotrina, princípios ativos do Icon 5 CS e do Demand 2,5 CS; Composto **(c)**,

deltametrina, princípio ativo do K-Othrine CE 25; e composto **(d)**, cipermetrina, princípio ativo do Cymperator 25 CE.

O Demand 2,5 CS apresenta-se comercialmente na forma microemcapsulada, procedimento no qual se recobre substâncias de interesse isolando-a e protegendo-a total ou parcialmente do ambiente. Esta tecnologia vem sendo empregada no desenvolvimento de formulações “inteligentes” em vários segmentos industriais. O microemcapsulamento pode ocorrer de duas formas distintas: Por coacervação complexa utilizando gelatina e goma arábica como materiais de parede e através do processo de gelificação iônica revestidas posteriormente com quitosana. Ambas as técnicas têm por finalidade recobrir pequenas partículas do material a ser encapsulado, compostos ativos, microrganismos ou material celular biologicamente ativo, visando: a) reduzir a reatividade do material encapsulado em relação às condições do meio como luz, oxigênio, umidade e temperatura; b) permitir a incorporação do recheio com um mínimo de perda de viabilidade biológica e, principalmente, c) controlar a taxa de liberação do material encapsulado, sendo este um dos grandes trunfos deste tipo de técnica. O Demand 2,5 CS, por apresentar-se na forma microemcapsulada possui vantagens sobre os demais que possuem o mesmo princípio ativo, pois diminui o risco à intoxicação do aplicador e age de maneira lenta e contínua sobre o foco do problema.

IV.4.6- RESULTADOS EXPERIMENTAIS DA UTILIZAÇÃO DE PESTICIDAS PIRETRÓIDES NO COMBATE A *Loxosceles intermedia*

Nos testes experimentais após a preparação das diferentes concentrações de pesticidas utilizados, estes foram aplicados em papel filtro qualitativo utilizado como substrato e acondicionados em placas de “petri” (**Figura 52**). Introduziu-se a aranha sobre o substrato colocando-se um pote plástico para evitar a fuga da mesma durante o experimento. O volume total de pesticida utilizado foi de 2 mL aplicado de maneira manual com ajuda de micropipeta. As aranhas foram observadas por período de tempo de até 24 horas.



Figura 52- A figura **(a)** apresenta o experimento em sua fase inicial; figura **(b)** apresenta a aranha morta após contato com o pesticida impregnado no substrato.

Dos pesticidas empregados nos testes de susceptibilidade o Demand 2,5 CS microemcapsulado foi o de melhor desempenho e o Cymperator 25 CE o menos efetivo. O efeito de “Knock down”, iniciou-se 2 horas após o contato com os pesticidas Demand 2,5 CS e Icon 5 CS, para o K-othrine CE 25 e para o

Cypermator 25 CE o efeito ocorreu somente após 4 horas, como apresentado por Hof *et al* (1995) em *Pardosa amentata* (Clerck, 1757) e *Pardosa pullata* (Clerck, 1757), aracnídeos da família Lycosidae, com o pesticida piretróide Karate (lambda-cialotrina).

A mortalidade provocada pelo efeito das diferentes concentrações dos produtos testados foi observada após 12 horas, para o Icon 5 CS a mortalidade ocorreu após 24 horas. Os **Gráficos 5-8** a seguir apresentam em detalhes as observações efetuadas com relação aos pesticidas aplicados.

Gráfico 5- Tempos de Knock down (KD) e Mortalidade (M) com papel filtro impregnado com Demand 2,5 CS (lambda-cialotrina microencapsulada 25 g/L).

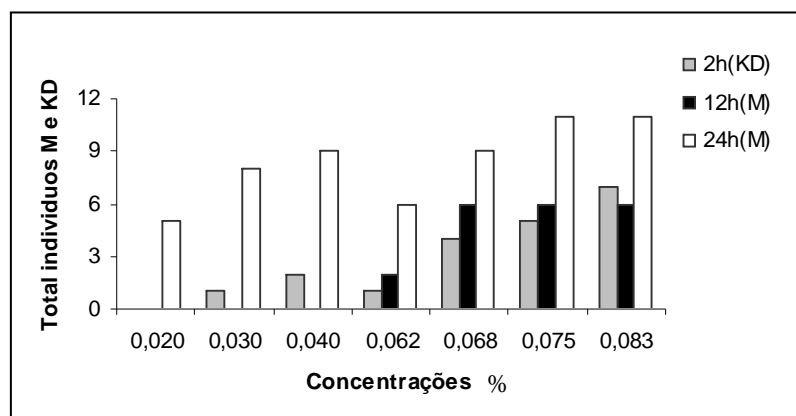


Gráfico 6- Tempos de Knock down (KD) e Mortalidade (M) com papel filtro impregnado com Icon 5 CS (lambda-cialotrina 50 g/L).

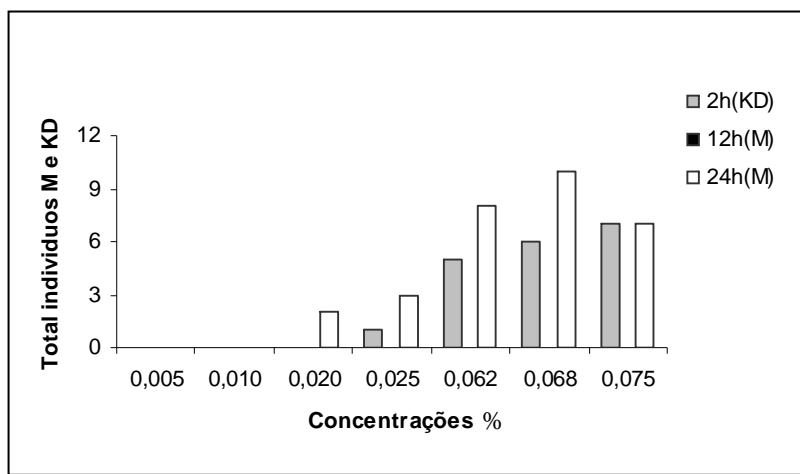


Gráfico 7- Tempos de Knock down (KD) e Mortalidade (M) com papel filtro impregnado com K-Othrine CE 25 (Deltametrina 25 g/L).

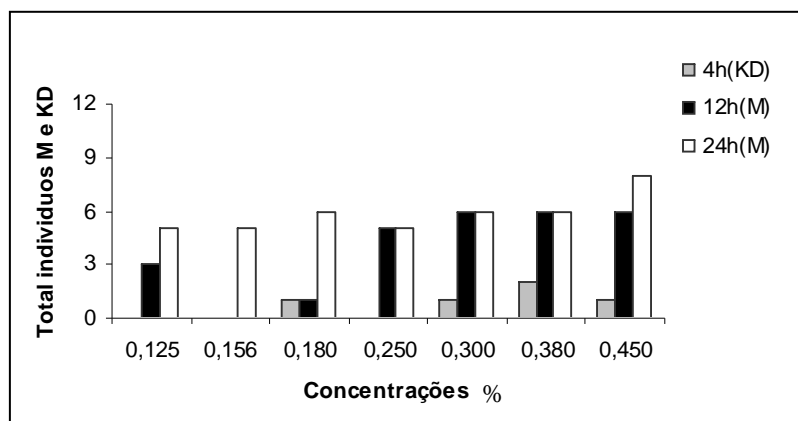
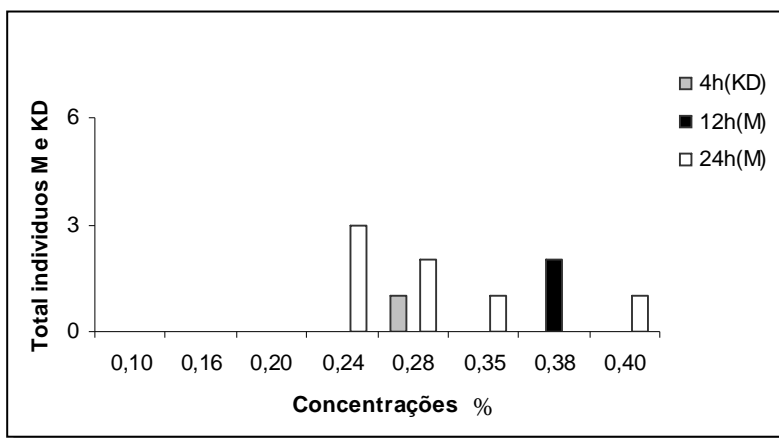


Gráfico 8- Tempos de Knock down (KD) e Mortalidade (M) com papel filtro impregnado com Cymperator 25 CE (Cipermetrina 250 g/L).



A **Tabela 14** a seguir, mostra os resultados obtidos com relação à concentração letal (CL) e às relações de concentração entre os pesticidas, sendo o de melhor eficiência o Demand 2,5 CS.

Tabela 14- Concentrações letais e relações de concentração dos pesticidas com melhor desempenho.

Pesticida	CL ₅₀ %	χ^2	SL	[] CL ₅₀ Pesticida/ CL ₅₀ demand 2.5
Demand 2,5 CS	0,023	6,4	2 ± 0,6	1
Icon 5 CS	0,047	5	4,2 ± 0,5	2,04
K-Othrine CE 25	0,260	3,2	8,2 ± 0,2	11,30
Cymperator 25 CE	1,38	7,3	4,5 ± 0,2	60

[]: Comparação entre os pesticidas com o de melhor desempenho

Os resultados obtidos nesta etapa do trabalho são coerentes com as experiências observadas em condições reais de campo (Secretaria do Estado da Saúde). Na cidade de Curitiba o pesticida Demand 2,5 CS microemcapsulado é o que apresenta melhor desempenho quando comparado com demais produtos (Ramires, comunicação pessoal 2007). No entanto, observou-se que as concentrações letais (CL) determinadas neste trabalho são maiores que as publicadas para outros pesticidas em *Loxosceles* (Wingo, 1964; Hite *et al.*, 1966; Norment & Patê, 1968; Levi & Spielman, 1968; Gladney & Dawkins, 1972). Essas diferenças podem ser atribuídas à metodologia empregada por estes autores. A metodologia aplicada nestes trabalhos relata a aplicação dos inseticidas diretamente no dorso do animal, aumentando assim a absorção do produto, e como consequência provocam maior mortalidade dos mesmos.

Neste trabalho optou-se pela aplicação dos pesticidas em substratos nos quais as aranhas foram colocadas em contato. Esta alteração metodológica proporcionou condições mais próximas da realidade, tendo em vista que dificilmente os pesticidas são aplicados diretamente sobre as aranhas em condições reais.

V- CONCLUSÕES

Os bioensaios realizados com indivíduos de *L. intermedia* em olfatômetro discriminante mostraram que machos são atraídos quando liberados contra um fluxo de ar que passou pelos corpos das fêmeas.

O extrato preparado através da lavagem dos corpos das fêmeas estimulou os indivíduos de *L. intermedia* a exibirem com mais frequência os padrões motores relacionados ao reconhecimento da espécie.

As fêmeas atacaram e mataram com mais frequência machos que haviam sido lavados com acetona, devido ao não reconhecimento.

Uma série de compostos cuticulares, *n*-alcanos, alcanos ramificados, ácidos carboxílicos de cadeia longa, cetonas, ésteres, aldeídos e possivelmente álcoois, já observados em outras espécies de aranhas, foram identificados tanto nos extratos preparados pela lavagem dos corpos das fêmeas quanto nos preparados pela lavagem dos corpos dos machos. Tais dados indicam que a identificação da espécie, efetuada pelos toques das pernas no corpo do parceiro no início do cortejo, deve ser mediada pela presença dos compostos cuticulares.

Dois compostos presentes apenas nos extratos preparados com as fêmeas, tanto pela técnica de lavagem dos corpos quanto pela de aeração, foram identificados. Ensaios comportamentais com esses compostos, na proporção identificada no extrato, mostraram que eles elicitam nos machos um número maior de padrões motores relacionados ao cortejo quando comparado com as fêmeas. Estes testes também mostraram que os machos responderam da mesma maneira quando se empregou o extrato com uma ou com duas fêmeas-equivalentes. Por

outro lado, as fêmeas responderam melhor quando se empregou o extrato contendo duas fêmeas equivalentes. Até o momento foram realizados bioensaios com o acetato de geranila e geranil acetona aplicados diretamente a substratos. Ensaios complementares serão realizados com o intuito de verificar a atração de machos por fêmeas a longa distância, assim como bioensaios com os compostos acetato de geranila e geranil acetona testados isoladamente.

Este resultado poderá levar à identificação do quarto feromônio de aranhas em nível mundial e o primeiro envolvendo uma espécie de aranha responsável pelo maior número de acidentes já registrados no mundo com conseqüências tão graves para a saúde das vítimas.

Os sinais acústicos-vibracionais emitidos no cortejo tanto por machos quanto pelas fêmeas foram, pela primeira vez, caracterizados. A vibração dos pedipalpos mostrou ser um importante padrão motor para *L. intermedia* tendo em vista ter sido observado em todas as interações sexuais. Bioensaios mostraram que tais sinais são importantes para a localização e reconhecimento do parceiro. Para *L. intermedia*, os sinais estridulatórios foram emitidos apenas a curta distância após o contato entre os parceiros.

As fêmeas emitiram sinais tremulatórios (vibração do abdômen) após os estridulatórios os quais são estimulados após o contato com os machos. Nenhuma cópula foi registrada sem a fêmea ter emitido sinais tremulatórios o que indica que estes sinalizam o grau de receptividade das fêmeas para os machos. Os sinais tremulatórios carregados tanto pelo ar quanto pelo substrato, se apresentaram com maior intensidade que os estridulatórios, o que pode estar indicando para outros machos na vizinhança a presença de uma fêmea receptiva. Os sinais

estridulatórios parecem ser mais importantes para os machos do que para as fêmeas tendo em vista que os machos vibraram seus pedipalpos em todas as fases do comportamento sexual enquanto as fêmeas vibraram seus pedipalpos inclusive em interações em que elas não aceitaram os machos.

Um procedimento simples para avaliar a eficiência de produtos com efeitos repelentes-desalojantes frente a *L. intermedia* foi desenvolvido e se mostrou bastante eficiente. Os produtos empregados pela população como repelentes-desalojantes de *L. intermedia* tiveram suas ações, pela primeira vez, sistematicamente avaliadas. Dentre os que apresentaram boa atividade destaca-se um produto que apresenta baixa toxicidade ao ser humano e um efeito repelente-desalojante comparado ao do *p*-dicloro benzeno, composto que apresenta maior toxicidade e que não pode ser utilizado em ambientes intradomiciliares com frequência. Os resultados obtidos podem levar ao desenvolvimento do primeiro repelente específico para aranhas em nível mundial e, neste caso, para uma espécie de aranha que se constitui num dos mais importantes casos de saúde pública envolvendo aranhas.

O efeito dos principais pesticidas empregados para o controle populacional de *L. intermedia* pelas empresas de controle de pragas foi avaliado. Um número bastante grande de aranhas foi empregado nos testes e a metodologia utilizada buscou reproduzir condições mais próximas da realidade, ou seja, expor as aranhas em contato com substrato no qual foi aplicado os pesticidas e não a aplicação dos pesticidas diretamente no dorso dos animais, como nos métodos descritos anteriormente. Os resultados evidenciaram o melhor desempenho do Demand 2,5 CS (25 g/L) microencapsulado, princípio ativo lambda-cialotrina

quando comparado com os demais piretróides, apresentando uma dose letal para 50% da população (CL_{50}) aproximadamente 60 vezes menor que o de pior desempenho, devendo ser o pesticida de escolha, no caso de se necessitar de uma intervenção desta natureza. Embora o Demand 2,5 CS apresente uma concentração inferior a dos demais pesticidas testados, sua eficiência torna-se pronunciada devido provavelmente ao microencapsulamento, as microcápsulas aderem ao corpo dos animais fazendo com que o princípio ativo seja liberado de maneira lenta e constante sobre o indivíduo alvo, apresentando-se assim mais eficiente ao combate de pragas.

Todos os conhecimentos acumulados neste trabalho serão testados, em conjunto com outros métodos de controle desenvolvidos por outros integrantes da equipe do projeto PRONEX intitulado “Monitoramento e Controle Populacional da Aranha-Marrom (*Loxosceles intermedia*): Semioquímicos, Limonóides de Meliaceae e Predadores Naturais”, visando a disponibilização de uma metodologia integrada que permita ao poder público controlar a população desta importante praga urbana.

VI- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALLAN, R. A.; ELGAR, M. A. & CAPON, R. J. Exploitation of an ant chemical alarm signal by the zodariid spider *Habronestes bradleyi* Walckenaer, **Proc. R. Soc. London, Ser. B.**, v. 263, p. 69-73, 1996.

ANDRADE, R.M.G.; OLIVEIRA, K.C.; GIUSTI, A.L.; SILVA, W.D.; TAMBOURGI, D.V. Ontogenic development of *Loxosceles intermedia* spider venom. **Toxicon.**, v. 37, p. 627-632, 1999.

ALARIO, A.; PRICE, G.; STAHL, R.; BANCROFT, P. Cutaneous necrosis following a spider bite: a case report and review. **Pediatrics.**, v. 79, p. 618–621, 1987.

ALBUQUERQUE, M. J.; PIRES DE CAMPOS, V. F.; RIBEIRO, L. A.; TAKAOKA, N. Y. Epidemiological and clinical aspects of accidents due to spiders in São Paulo State, Brazil, in 1988. **Toxicon.**, v. 28, p. 599, 1990.

AYYAGARI, L. R. & TIETJEN, W. J. Preliminary isolation of male inhibitory pheromone of the spider *Schizocosa ocreata* (Araneae, Lycosidae), **J. Chem. Ecol.**, v. 13, p. 237-244, 1986.

BAARLEN, P. V.; TOPPING, C. J. & SUNDERLAND, K. D. Host location by *Gelis festinans*, an eggsac parasitoid of the linyphiid spider *Erigone atra*. **Entomol Exp. Appl.**, v. 81, p. 155-163, 1996.

BAGNÈRES, A.-G., TRABALON, M., BLOMQUIST, G. J. & SCHULZ, S. Waxes of the social spider *Anelosimus eximus*; Abundance of novel *n*-propyl esters of long-chain methyl-branched fatty acids, **Arch. Insect Biochem. Physiol.**, v. 36, p. 295-314, 1997.

BALANDRIN, M. F.; KLOCKE, J. A.; WURTELE, E. S.; BOLLINGER, W.H. **Science.**, v. 228, p. 1154, 1985.

BARBARO, K.C.; JARED, C.; MOTA, I.; Aranhas venenosas no Brasil. **Ciência Hoje.**, v. 19, p. 48-52, 1995.

BARBARO, K.C.; FERREIRA, M.L.; CARDOSO, D.F.; EICKSTEDT, V.R.D.; MOTA, I.; Identification and neutralization of biological activities in the venoms of *Loxosceles* spiders. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 29, p. 1491-1497, 1996.

BARBARO, K.C.; KNYSACK, I.; MARTINS, R.; HOGAN, C.; WINKEL, K. Enzymatic characterization, antigenic cross-reactivity and neutralization of dermonecrotic activity of five *Loxosceles* spider venoms of medical importance in the Americas. **Toxicon.**, v. 45, p. 489-499, 2005.

BARRETT, S.M.; ROMINE-JENKINS, M.; FISHER, D.E. Dapsone or electric shock therapy of brown *recluse* spider envenomation. **Ann. Emerg. Med.**, v. 24, p. 21-25, 1994.

BARTH, F. G.; SCHMITT, A. Species recognition and species isolation in wandering spiders (*Cupiennius* spp.; Ctenidae). **Behav. Ecol. Sociobiol.**, v. 29, p. 333-339, 1991.

BARTH, F. G. **A spider's world**. Berlin: Springer Verlag, 2002.

BASCUR, L.; YEVENES, I.; BARJA, P. Effects of *Loxosceles laeta* spider venom on blood coagulation. **Toxicon.**, v. 20, p. 795-796, 1982.

BINFORD, G. J.; CORDES, M. H. J.; WELLS, M. A.; Sphingomyelinase D from venoms of *Loxosceles* spiders: evolutionary insights from DNA sequences and gene structure. **Toxicon.**, v. 45, p. 547-560, 2005.

BORKKAN, J.; GROSS, E.; LUBIN, Y.; ORYAN, I. An outbreak of venomous spider bites in a citrus grove. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 52, p. 228-230, 1995.

BRISTOWE, W. S. & LOCKET, G. H. The courtship of British lycosid spiders, and its probable significance, **Proc. Zool. Soc. London.**, p. 317-347, 1926.

BÜCHERL W. Aranhas do Rio Grande do Sul. **Memórias do Instituto Butantan**, v. 24 (2), p. 127-156, 1956.

BÜCHERL W. *Loxosceles* y loxoscelismo en América del Sur. III. *Loxosceles laeta* (Nicolet) 1849 no existe. **Bol. Chileno Parasitol.**, v. 15(4), p. 73-77, 1960a.

BÜCHERL W. Aranhas do gênero *Loxosceles* e loxoscelismo na América. **Ciência e Cultura**, v. 13(4), p. 213-224, 1960b.

BÜCHERL W. *Loxosceles* y loxoscelismo en América del Sur. IV. Nicolet en 1849 describió la *Loxosceles rufipes* (Lucas)1834 y estableció que esta especie se encuentra en Chile. **Bol. Chileno Parasitol.**, v. 17(3), p. 66-69, 1960c.

BÜCHERL, W. Aranhas do gênero *Loxosceles* e loxoscelismo na América. **Ciência e Cultura** v. 13, p. 213-224, 1961.

BÜCHERL W. *Loxosceles* y loxoscelismo en América del Sur. I. Introdução, comentários bibliográficos, caracterização da subfamília Loxoscelinae, do gênero *Loxosceles* e enumeração das espécies da América do Sul. **Memórias do Instituto Butantan**, v. 30, p. 167-186, 1964a.

BÜCHERL W. *Loxosceles* y loxoscelismo en América del Sur. V. As espécies sulamericanas do gênero *Loxosceles* Heineken e Lowe. **Memórias do Instituto Butantan**, v. 31, p. 15-54, 1964b.

BÜCHERL, W. As aranhas. **In Invertebrados**. 1ª ed., Edart, São Paulo, 1972.

CAMARGO, H.F. DE A. Sobre algumas aranhas que ocorrem no Brasil, com descrição de um alótipo (Arachnida, Araneae). **Papéis Avulsos de Zoologia**., v. 11(19), p. 301-340, 1953.

CAMPBELL, I. G. M.; HARPER, S. H.; **J. chem Soc.**, v.7, p. 473, 1978.

CARSON, R. **Silent Spring**, Houghton mifflin Co., Boston, 1962

CHAIM, O. M.; SADE, Y. B.; DA SILVEIRA, R. B.; KALAPOTHAKIS, L. T. E.; OLÓRTEGUI, C.; MANGILI, O. C.; GREMSKI, W.; DIETRICH, C. P.; NADER, H. B.; VEIGA, S.S.; Brown spider dermonecrotic toxin directly induces nephrotoxicity. **Toxicology and applied Pharmacology**., v. 211, p.64-77, 2006.

CLARK, D. L.; UETZ, G. W. Video image recognition by the jumping spider, *Maevia inclemens* (Araneae, Salticidae). **Animal behaviour**., v. 40, p. 884-890, 1990.

CLARK, D. L.; UETZ, G. W. Signal efficacy and the evolution of male dimorphism in the jumping spider, *Maevia inclemens*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**., v. 90, p. 11954-11957, 1993.

CLARK, R. J.; JACKSON, R. R. & CUTLER, B. Chemical cues from ants influence

predatory behavior in *Habrocestum pulex*, an ant-eating jumping spider (Araneae, Salticidae), **J. Arachnol.**, v. 28, p. 309-318, 2000.

CLARK, D. L.; MORJAN, C. L. Attracting female attention: the evolution of dimorphic courtship displays in the jumping spider *Maevia inclemens* (Araneae: Salticidae). **Proceedings of the Royal Society of London, series B Biologic Science.**, v. 268, p. 2461-2465, 2001.

CLARK, D. L.; BIESIADICKI, B. Mating success and alternative reproductive strategies of the dimorphic jumping spider, *Maevia inclemens* (Araneae, Salticidae). **Journal of Arachnology.**, v. 30, p. 511-518, 2002.

CODDINGTON, J. A.; LEVI, H. W. Systematics and Evolution of Spiders (Araneae). **Ann Rev Ecol Syst.**, v. 22, p. 565-92, 1991.

COHEN, N.; SARAFIAN, D. A.; ALON, I.; GORELIK, O.; ZAIDENSTEIN, R.; SIMANTOV, R.; BLATT, A.; LITINSKY, I.; MODAI, D.; GOLIK, A. Dermonecrotic loxoscelism in the Mediterranean region. **J. Toxicol. Cut. Ocular Toxicol.**, v. 18, p. 75- 83, 1999.

COUTINHO, N. L. R. Avaliação funcional e histopatológica das alterações renais induzidas pelo veneno da “aranha-marrom” *Loxosceles intermedia*” (Mello-Leitão, 1934). **Dissertação de Mestrado em Morfologia e Biologia Celular.** Universidade Federal do Paraná, 1996.

da SILVA, P. H.; da SILVEIRA, R. B.; APPEL, M. H.; MANGILI, C. O.; GREMSKI, W.; VEIGA, S. S. Brown Spiders and Loxoscelim. **Toxicon.**, v. 44, p. 693-709, 2004.

da SILVA & FISCHER. Distribuição das espécies do gênero *Loxosceles* Heineken & Lowe, 1835 (Araneae; Sicariidae) no Estado do Paraná. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical.**, v. 38(4), p. 331-335, 2005.

da SILVEIRA, R. B.; FILHO, J. F. S.; MANGILI, O. C.; VEIGA, S. S.; GREMSKI, W.; NADER, H. B.; DIETRICH, C. P. Identification of proteases in the extract of venom glands from brown spiders. **Toxicon.**, v. 40, p. 815-822, 2002.

DICKE, M.; SABELIS, M. W. Infochemical terminology: should it be based on cost-benefit analysis rather than origin of compounds. **Funct. Ecol.**, v. 2, p. 131-139, 1988.

dos SANTOS, V. L. P.; FRANCO, C. R. C.; VIGGIANO, R. L. L.; DA SILVEIRA, R. B.; CANTÃO, M. P.; MANGILI, O. C.; VEIGA, S. S.; GREMSKI, W. Structural and ultrastructural description of the venom gland of *Loxosceles intermedia* (brown spider). **Toxicon.**, v. 38, p. 265-285, 2000.

EBERHARD, W. G. Aggressive chemical mimicry by bolas spiders, **Science.**, v. 198, p. 1173-1175, 1977.

EDWARDS, G. B. Sound production by courting males of *Phidippus mystaceus* (Araneae: Salticidae). **Psyche.**, v. 88, p. 199-214, 1981.

EICKSTEDT, V. R. Aranhas de importância médica no Brasil. Em: **Venenos animais**. 1º ed.. Ed. Barravera, B., Epuc, São Paulo, p. 151, 1994.

ELIAS, O. E.; MASON, A. C.; MADDISON, W. P.; HOY, R. R. Seismic signals in a courting male jumping spider (Araneae: Salticidae). **Journal of Experimental Biology.**, v. 206, p. 4029-4039, 2003.

ELLIOTT, M.; FARNHAM, A. W.; JANES, N. F.; NEEDHAM, P. H.; PEARSON, B. C.; **Nature.**, v. 213, p. 493, 1967.

ELLIOTT, M.; FARNHAM, A. W.; JANES, N. F.; NEEDHAM, P. H.; PULMAN, D. A.; STEVENSON, J. H. **Nature.**, v. 246, p. 169, 1973.

ELLIOTT, M.; FARNHAM, A. W.; JANES, N. F.; NEEDHAM, P. H.; PULMAN, D. A.; **Nature.**, v. 248, p. 710, 1974.

ELLIOTT, M.; Janes, N. F.; **Advances in Pesticides Science**, H. Geissbuchler, Ed. Pergamon Press; New York., v. 2, p. 166, 1979.

ESCALANTE-GALINDO, P.; MONTOYA-CABRERA, M.A.; TERROBA-LARIOS, V.M.; NAVA-JUARÉZ, A.R.; ESCALANTE-FLORES, I. Local dermonecrotic loxoscelism in children bitten by the spider *Loxosceles reclusa* (the “violin”spider). **Gac. Med. Mex.**, v. 135, p. 423-426, 1999.

ETO, M.; **Organophosphorus Pesticides: Organic and Biological Chemistry**, CRC Press; Cleveland, Ohio., p. 144, 1974.

FEITOSA, L.; GREMSKI, W.; VEIGA, S.S.; ELIAS, M.C.Q.B.; GRANER, E.; MANGILI, O.C.; BRENTANI, R.R. Detection and characterization of metalloproteinases with gelatinolytic, fibronectinolytic and fibrinogenolytic activities in brown spider (*Loxosceles intermedia*) venom. **Toxicon.**, v. 36, p. 1039-1051, 1998.

FINNEY, D. J. **Probit Analysis.**, Ed. S. Chand & Company Ltd, Ram Nagar, New Delhi, p. 333, 1981.

FERREIRA, S. A. Análise dos estágios iniciais do desenvolvimento embrionário da aranha marrom “*Loxosceles intermedia*”. Curitiba, 2001. **Dissertação (Mestrado em Biologia Celular)** - Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

FISCHER, M. L. Levantamento de espécies de *Loxosceles* Heinecken & Lowe 1832 no município de Curitiba, Paraná, Brasil. **Estudos de Biologia.**, v. 3, p. 63, 1994.

FISCHER, M. L. Biologia e Ecologia de *Loxosceles intermedia*, Mello & Leitão, 1934 (Aranea:Sicariidae) no município de Curitiba, PR. **(Dissertação de mestrado)**, Ciências Biológicas, UFPR, 1996.

FISCHER, M. L.; VASCONCELLOS-NETO, J. Comportamento sexual de *Loxosceles intermedia* Mello-Leitão, 1934 (Araneae; Sicariidae). **Revista de Etologia.**, v. 2, p. 31-42, 2000.

FISCHER, M. L. & MARQUES-DA-SILVA, E. Comportamento sexual de *Loxosceles hirsuta* Mello-Leitão, 1931 (Araneae; Sicariidae). **Estudos de Biologia.**, v. 47, p. 7, 2001.

FOELIX, R. F. Biology of Spiders. **2nd Ed, New York/Oxford, Oxford University Press, 1996.**

FORRESTER, L. J.; BARRET, J.T.; CAMPBELL, B.L. Red blood cell lysis induced by the venom of the brown *reclusa* spider. The role of sphingomyelinase D. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 187, p. 335-365, 1978.

FURLANETTO, R. S. Estudos sobre a preparação do sôro antiloxoscélico. São Paulo, 1961. **Tese para docência livre da Cadeira de Microbilologia, do Curso de Odontologia** - Faculdade de Farmácia e Odontologia, Universidade de São Paulo.

FUTRELL, J. M. Loxoscelism. **Am. J. Med. Sci.**, v. 304, p. 261-267, 1992.

GAJARDO-TOBAR, R. R. Minha experiência sobre loxoscelismo. **Mem. Inst. Butantan.**, 33:689-698, 1966.

GALEFFI, C. B.; MARINI BETTOLO, G. B.; **Fitoterapia.**, v. 59, p. 179, 1988.

GALIANO, M. E.; Ciclo biológico y desarrollo de *Loxosceles laeta* (Nicolet, 1849). **Acta Zoologica Liliana.**, v. 23, p. 431, 1967.

GASPARELLO-CLEMENTE, E.; SILVEIRA, P. F. Fluorometric assay using naphthylamide substrates for assessing novel venom peptidase activities. **Toxicon.**, v. 40, p. 1617-1626, 2002.

GEMENO, C.; YEARGAN, K. V. & HAYNES, K. F. Aggressive chemical mimicry by the bolas spider *Mastophora hutchinsoni*: Identification and quantification of a major prey's sex pheromone components in the spider's volatile emissions, **J. Chem. Ecol.**, 26, 1235-1243, 2000.

GERTSCH, W. J. The spider genus *Loxosceles* in South America (Araneae, Scytodidae), **Bulletin of the American Museum of Natural History.**, v. 136, New York, 1967.

GERTSCH, W. J. & ENNIK, F. The spider genus *Loxosceles* in North America, Central America and the West Indies (Araneae, Loxoscelidae). **Bulletin of the American Museum of Natural History.**, v. 175, p. 246-360, 1983.

GLATZ, L. Correlation entre le capture de la proie et les structures des pièces buccales ches les Uloboridae. **Bull Mus Nat Hist.**, v. 41(1), p. 65-69, 1969.

GNADINGER, C. B.; **Pyrethrum Flowers**, McLaughlin Gormley King Co.; Minneapolis, Minnesota., p. 3, 1936.

GONÇALVES DE ANDRADE R. M.; PRETEL, F. D; TAMBOURGI. D. V. The spider *Loxosceles adalaida* Gertsch, 1967 in the karstic area of Ribeira Valley, PETAR, São Paulo, Brazil. **Journal of Entomology.**, v. 4(1), p. 46-50, 2007.

GUNTHER, F. A.; JEPPSON, L. R.; **Modern Insecticides And World Food Production**, John Wiley & Sons, New York, p. 192, 1960.

GWYNNE, D. T.; DADOUR, I. R. A new mechanism of sound production by courting male jumping spiders (Araneae: Salticidae, *Saitis michaeleseni* Simon). **Zoological Society of London.**, v. 207, p. 35-42, 1985.

HEAD, S. W. **Pyrethrum-The Natural Insectide.**, J.E Casida, Ed.; Academic Press, p. 26, 1973.

HERRMANN, W. A.; KÜHN, F. **Acc. Chem. Res.**, v. 30, p. 169, 1997.

HERRMANN, W. A.; FISCHER, R. W.; MARZ, D. W. **Angew. Chem. Int. Edit.**, v. 30, p. 1638, 1991.

HITE, M. J.; GLADNEY, W. J.; LANCASTER, J. L. JR.; WHITCOMB, W. H. **Biology of the brown recluse spider.**, Arkansas Agricultural Experiment Station Bulletin., v. 711, p. 2-26, 1966.

HORNER, N. V. & STEWART, K. W. Life history of the brown spider, *Loxosceles reclusa* Gertsch and Muliak. **Texas Journal of Sciences.**, v. 19, p. 333, 1967.

HUTCHINSON, D. E. A bolas throwing spider, **Sci. Am.**, v. 89(10), p. 172, 1903.

ISBISTER, G. K.; GRAUDINS, A.; WHITE, J.; WARRELL, D. Antivenom treatment in arachnidism. Clin. **Toxicol.**, v. 41(3), p. 291-300, 2003.

ISMAN, M. B.; KLOCKE, J. A. **J. Agric. Food Chem.**, v. 35, p. 467, 1987.

ITAYA, N.; KAMOSHITA, K.; KITAMURA, S.; OKUNO, Y.; MIZUTANI, T.; NAKAI, S.; KAMEDA, N.; FUJIMOTO, K.; **Ger. Offen.**, v. 1, p. 926, 1969.

JACKSON, R. R. Courtship versatility in the jumping spider, *Phidippus johnsoni* (Araneae: Salticidae). **Animal Behaviour**., v. 25, p. 953-957, 1977.

KASTON, B. J. The senses involved in the courtship of some vagabond spiders, **Entomol. Amer.**, v. 16, p. 97-169, 1936.

KEYSERLING, E. **Die Spinnen Amerikas, I. Laterigradae Nürnberg.**, v. 1, 1-283, 1880.

KING, J. R., Brown recluse spider bites: stay cool. **Letter to the.**, editor. *Jama.*, v. 20, p. 2895-2896, 1985.

KLOPFER, P.H.; HATCH, J. J. Experimental considerations In : Sebeok, T.A. (ed.), **Animal communication.**, University of Indiana Press, Bloomington, 1968.

KUHR, R. J.; DOROUGH, H. W. **Carbamate Insecticides: Chemistry, Biochemistry and toxicology.**, CRC Press; Cleveland, Ohio, p. 71, 1976.

LEBORGNE, R. Soie et communication chez les araignées (le rapprochement des sexes), **Atti Soc. Tosc. Sci. Nat.**, v. 88, p. 132-142, 1981.

LENDL, A. *Trochosa infernalis* Motschl. párzásáról és párzási szerveiről, **Temr Füzetek.**, v. 11, p. 30-39, 1887/88.

LEVI, H. W. & SPIELMAN. A. The biology and control of the South American brown spider *Loxosceles laeta* (Nicolet), in a North American focus. **J. Trop. Med. and Hyg.**, v. 13, p. 132-136, 1964.

LEWIS, B. AND GOWER, M. **Biology of communication**. Blackie, Lodon, p. 239, 1980.

LOWRIE, D. C. Starvation longevity of *Loxosceles laeta* (Nicolet) (Araneae). **Ent. News.**, v. 91(4), p. 130-132, 1980.

LOWRIE, D. C. Effects of diet on the development of *Loxosceles laeta* (Nicolet) (Araneae, Loxoscelidae). **J. Arachnol.**, v. 15, p. 303-308, 1987.

MANFREDINI, L.; MALUF, E. M. C. P.; CARVALHO, D. S; OKABE, I.; MANGILI, O. Loxosceles: "a aranha marrom". **Cadernos de Saúde.**, v. 1(2), p. 1-10, 1993.

MARTINEZ-VARGAS, A. Z. Loxoscelismo, um problema de salud en el Perú. **Bol. San. Panam.**, v. 103, p. 378-386, 1987.

MASTERS, E. J.; SAMS, H.; KING JR.; L. E., Loxoscelism. The author reply. N. Engl. **J. Med.**, v. 339(26), p. 1945-1946, 1998.

MAYNOR, M. L.; MOON, R. E.; KLITZMAN, B.; FRACICA, P. J., CANADA, A., Brown recluse spider envenomation: a prospective trial of hyperbaric oxygen therapy. **Acad. Emerg. Med.**, v. 4(3), p. 184-192, 1997.

MELLO-LEITÃO, C. F. Scytodidae e Pholcidae do Brasil. **Revista do Museu Paulista**, v. 10, p. 93-144, 1918.

MELLO-LEITÃO, C. F. Espécies brasileiras do gênero *Loxosceles* Lowe. **Ann Acad Brasileira Sci.**, v. 6, p. 69-73, 1934.

MELLO-LEITÃO, C. F. Algumas aranhas da região amazônica. Bol Mus Nac Rio de Janeiro, **New Ser. Zool**, v. 25, p. 1-12, 1944.

MIZUMOTO, J.; BROCHURE, **Sumitomo Chemical Co.**, Ltd. p. 8, 1988.

MONTEIRO, C. L. B.; RUBEL, R.; COGO, L. L.; MANGILI, O. C.; GREMSKI, W.; VEIGA, S.S., Isolation and identification of *Clostridium perfringens* in the venom and fangs of *Loxosceles intermedia* (brown spider): enhancement of the dermonecrotic lesion in loxoscelism. **Toxicon**, v. 40, p. 409-418, 2002.

NICHOLSON, G M.; GRAUDINS, A. Antivenoms for the treatment of spider envenomation. **J. Toxicol. Toxins Reviews**, v. 22, p. 35-59, 2003.

NORDLUND, D. A. AND LEWIS, W. J. Terminology of chemical-releasing stimuli in intraspecific and interspecific interactions. **J. Chem. Ecol.** v. 2, p. 211-220, 1976.

OLIVEIRA, K. C.; GONÇALVES DE ANDRADE, R. M.; PIAZZA, R. M.; FERREIRA, J. ; VAN DEN BERG, C. W.; TAMBOURGI, D. V. Variations in *Loxosceles* spider venom composition and toxicity contribute to the severity of envenomation. **Toxicon.**, v. 45(4), p. 421-9, 2005.

OSPEDAL, K. Z.; APPEL, M. H.; NETO, J. F.; MANGILI, O. C; VEIGA, S. S.; GREMSKI, W. Histopathological findings in rabbits after experimental acute exposure to the *Loxosceles intermedia* (brown spider) venom. **Int. J. Exp. Path.**, v. 84, p. 287-294, 2002.

PAPKE, M.; SCHULZ, S.; TICHY, H.; GINGL, E. & EHN, R. Identification of a new sex pheromone from the silk dragline of the tropical wandering spider *Cupiennius salei*, **Angew. Chem., Int. Ed.**, v. 39, p. 4339-4341, 2000.

PAPKE, M.; RIECHERT, S. E.; SCHULZ, S. **Animal Behav.**, v. 61, p. 877-886, 2001.

PATEL, K. D.; MODUR, V.; ZIMMERMAN, G. A.; PRESCOTT, S. M.; MCINTYRE, T. M. The necrotic venom of brown recluse spider induces dysregulated endothelial cell-dependent neutrophil activation. **J. Clin. Invest.**, v. 94, p. 631-642, 1994.

PAULI, I.; PUKAC, J.; GUBERTD, I. C.; MINOZZOA, J. C. The efficacy of antivenom in loxoscelism treatment. **Toxicon.**, v. 48, p. 123–137, 2006.

PHILLIPS, S.; KOHN, M.; BAKER, D.; VANDER LEEST, R.; GOMEZ, H.; MCKINNEY, P.; MCGOLDRICK, J.; BRENT, J.; Therapy of brown spider envenomation: a controlled trial of hyperbaric oxygen, dapsone, and cyproheptadine. **Ann. Emerg. Med.**, v. 25 (3), p. 363-368, 1995.

PIZZI, T.; ZACARIAS, J.; SCHENONE, E. H. Estudio histopatológico experimental en el envenenamiento por *Loxosceles laeta*. **Pathologica.**, p. 23-33, 1957.

PLATNICK, N. I.; CODDINGTON JA, FORSTER RR, GRISWOLD CE. Spinneret morphology and the phylogeny of haplogyne spiders (Araneae, Araneomorphae). **Am Mus Novit.**, v. 3016, p. 1-73, 1991.

PLATNICK, N. I & GERTSCH, W. The suborders of spiders: a cladistic analysis (Arachnida, Araneae). **Am Mus Novitates.**, v. 2607, p. 1-15, 1976.

PLATNICK, N. I. The World Spider Catalog. Internet version. **American Museum of Natural History**, NY, 2007.

POLLARD, S. D.; MACNAB, A. M. & JACKSON, R. R. **Communication with chemicals: Pheromones and spiders**, in *Ecophysiology of spiders.*, ed.

W. Nentwig, Springer, Berlin, p. 133-141, 1987.

PRETEL. F, GONCALVES-DE-ANDRADE, R. M.; MAGNOLI, F. C.; da SILVA, M. E.; FERREIRA, J. M. JR, VAN DEN BERG CW, TAMBOURGI DV. Analysis of the toxic potential of venom from *Loxosceles adelaida*, a Brazilian brown spider from karstic areas. **Toxicon.**, v. 45 (4), p. 449-58, 2005.

RAMIRES, E. N. Uma abordagem comparativa ao comportamento defensivo, agonístico e locomotor de três espécies de aranhas do gênero *Loxosceles* (Sicariidae), **Tese de Doutorado**, 1999.

RAMIRES, E. N. Produção de fios de seda em forma de fita em aranhas do gênero *Loxosceles* (Sicariidae). Tuiuti: **Ciência e Cultura.** v. 15, p. 11-17, 2000.

RAMIRES, E. N. "Ribbon-threads" in the webs of brown spiders (*Loxosceles spp.*). **In Micscape Magazine.** p. 1-4, 2002.

RAMIRES, E. N.; FRAGUAS, MILANI. G. Tropical house gecko (*Hemidactylus mabouia*) predation on brown spiders (*Loxosceles intermedia*). **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases.**, v. 10, n. 2, p. 185-190, 2004.

RASH, L. D.; HODGSON, W. C. Pharmacology and biochemistry of spider venoms. **Toxicon.**, v. 40, p. 225-254, 2002.

RAVEN, R. J. The spider infraorder Mygalomorphae (Araneae): Cladistics and systematics. **Bull. Amer Mus Nat Hist.**, v. 182, p. 1-180, 1985.

REES, R. S.; NANNEY, L. B.; YATES, R. A.; KING, L. E. Interaction of brown recluse spider venom on cell membranes: The inciting mechanism. **J. Invest. Dermatol.**, v. 83, p. 270-275, 1984.

REES, R. S.; FIELDS, J. P.; KING, L. E. Do brown recluse spider bites induce pyoderma gangrenosum. **South Med. J.**, v. 78, p. 283-287, 1985.

REES, R. S.; CAMPBELL, D.; RIEGER, E.; KING JR., L. E. The diagnosis and treatment of brown recluse spider bites. **Ann. Emerg. Med.**, v. 16, p. 945-949, 1987.

REES, R. S.; GATES, C.; TIMONS, S.; DES-PRES, R. M.; KING, L. E. JR. Plasma components are required for platelet activation by the toxin of *Loxosceles reclusa*. **Toxicon.**, v. 26, p. 1035-1046, 1988.

RIBEIRO, L. A.; EICKSTEDT, V. R. D.; RÚBIO, G. B. G.; KONOLSAISEN, J. F.; HANDAR, Z.; ENTRES, M.; CAMPOS, V. A. F. P. & JORGE, M. T. Epidemiologia dos acidentes por aranhas do gênero *Loxosceles* Heineken & Lowe no Estado do Paraná (Brasil). **Mem. Inst. Butantan.**, v. 55(1), p. 19-26, 1993.

RIECHERT, S. E; SINGER, F. D. Investigation of potential male mate choice in a monogamous spider, **Anim. Behav.**, v. 49, p. 719-723, 1995.

RINALDI, I. M. P.; FORTI, L. C.; STROPA, A. A. On the development of the brown spider *Loxosceles gaucho* Gertsch (Araneae, Sicariidae): the nympho-imaginal period. **Rev. Bras. Zool.**, v. 14(3), p. 697-706, 1997.

RINALDI, I. M. P. & STROPA, A. A. Sexual behaviour in *Loxosceles gaucho* Gertsch (Araneae; Sicariidae). **Bulletin of the British Arachnological Society.**, v. 11, p. 57, 1998.

ROBERTSON, J. L.; PREISLER, H. K. **Pesticide Bioassays with Arthropods.**, CRS Press. USA. p. 127, 1992.

ROVNER, J. S.; BARTH, F. G. Vibratory Communication Through Living Plants by a Tropical Wandering Spider, **Science.**, v. 214, p. 464-466, 1981.

RUPPERT, E. E.; BARNES, R. D. **Zoologia dos invertebrados.**, Ed. Roca, São Paulo, 6ª ed., 1996.

SAMS, H. H.; DUNNICK, C. A.; SMITH, M. L.; KING, JR. L. E., Necrotic arachnidism. **J. Am. Acad. Dermatol.**, v. 44(4), p. 561-573, 2001.

SCHECHTER, M. S.; GREEN, N.; LAFORGE, F. B.; **J. Am. Chem. Soc.**, v. 71, p. 3165, 1949.

SCHENONE, H. E.; LETONJA, T. Notas sobre la biología y distribución geográfica de las arañas del género *Loxosceles*. **Bol. Chil. Parasitol.**, v. 30, p. 27-29, 1975.

SCHENONE, H.; Loxoscelismo en Chile. Estudios epidemiológicos, clínicos y experimentales. **Rev. Inst. Med. Trop.**, v. 31(6), p. 403-415, 1989.

SCHENONE, H. Cutaneous loxoscelism with an edematous predominance. **Bol. Chil. Parasitol.**, v. 53, p. 78-83, 1998.

SCHUCK-PAIM, C. Orb-webs as extended-phenotypes: Web design and size assessment in contests between *Nephilengys cruentata* females (Araneae, Tetragnathidae), **Behaviour.**, v. 137, p. 1331-1347, 2000.

Schulz, S. & Toft, S. Identification of a sex pheromone from a spider, **Science.**, v. 260, p. 1635-1637, 1993b.

SCHULZ, S. Mass spectrometric determination of methyl group positions in long chain methyl ethers and alcohols *via* nitriles, **Chem. Commun.**, p. 969-970, 1997.

SCHULZ, S.; TOFT, S. Identification of a sex pheromone from a spider, **Science.**, v. 260, p.1635-1637, (1993b).

SCHULZ, S. **Structural diversity of surface lipids from spiders**, in **Bioorganic Chemistry - Highlights and New Aspects.**, eds. U. Diederichsen, T. K. Lindhorst, B. Westermann & L. A. Wessjohann, Wiley-VCH, Weinheim, p. 1-7, 1999.

SCHULZ, S.; R. EHN.; H. TICHY. Composition of the silk lipids of the spider *Nephila chavipes*, **lipids.**, v. 36 (6), p. 637-647, 2001.

SCHULZ, S.; Cardé, R. T.; MILLAR, J. G. Semiochemistry of Spiders. In **Advances in Insect Chemical Ecology.**, Ed. Cambridge University Press, Cambridge, 2004.

SEARCY, L. E.; RYPSTRA, A. L. & PERSONS, M. H. Airborne chemical communication in the wolf spider, *Pardosa milvina*. **Journal of Chemical Ecology** v. 25, p. 2527-2533, 1999.

SEZERINO, U.; ZANNIN, M.; COELHO, L. K. **A clinical and epidemiological study of *Loxosceles* spider envenoming in Santa Catarina, Brasil.**, Trans. R. Soc. Trop. Méd. Hyg., v. 92, p. 546, 1998.

SHAO, Z. & VOLLRATH, F. The effect of solvents on the contraction and mechanical properties of spider silk, **Polymer.**, v. 40, p. 1799-1806, 1999.

SMITH, W. C.; MICKS, W. D. The role of polymorphonuclear leukocytes in the lesion caused by the venom of the brown spider, *Loxosceles reclusa*. **Lab. Invest.**, v. 22, p. 90-93, 1970.

SOERENSEN, B. **Acidentes por animais peçonhentos: reconhecimento, clínica e tratamento.**, Ed. Atheneu, 1996.

STERN, H. ; KULLMANN, E. **Leben am seidenen Faden** - Die rätselvolle Welt der Spinnen. München, Kindler Verlag, 1981.

STEWART, D. M. **Endocrinology of arachnids**, in *Endocrinology of Selected Invertebrate Types.*, eds. H. Laufer & G. H. Downer, Alan R. Liss, New York, p. 415-428, 1988.

Stowe, M. K.; Tumlinson, J. H. & Heath, R. R. Chemical mimicry: Bolas spiders emit components of moth prey species sex pheromones, **Science.**, v. 236, p. 964-967, 1987.

SUTER, R. B.; SHANE, C. M. & HIRSCHHEIMER, A. J. *Frontinella pyramitela* detects *Argyrodes trigonum* via cuticular chemicals, **J. Arachnol.**, v. 17, p. 237-240, 1989.

SWANSON, D. L.; VETTER, R. S.; Medical progress: bites of brown recluse spiders and suspected necrotic arachnidism. **N. Engl. J. Med.**, v. 352 (7), p. 700-707, 2005.

TAMBOURGI, D. V.; MAGNOLI, F. C.; EICKSTEDT, V. R. D.; BENEDETTI, Z. C.; PETRICEVICH, V. L.; SILVA, W. D. Incorporation of a 35-kilodalton purified protein from *Loxosceles intermedia* spider venom transforms human erythrocytes into activators of autologous complement alternative pathway. **J. Immunol.**, v. 155, p. 4459- 4466, 1995.

TICHY, H.; GINGL, E.; EHN, R.; PAPKE, M.; SCHULZ, S. Female sex pheromone of a wandering spider: Identification and sensory reception, **J. Comp. Physiol. A.**, v. 187, p. 75-78, 2001.

TIETJEN, W. J. Dragline-following by male lycosid spiders, **Psyche.**, v. 84, p. 165-178, 1977.

TIETJEN, W. J. & ROVNER, J. S. Trail-following behaviour in two species of wolf spiders: Sensory and etho-ecological concomitants, **Anim. Behav.**, v. 28, p. 735-741, 1980.

TIETJEN, W. J.; AYYAGARI, L. R. & UETZ, G. W. Symbiosis between social spiders and yeast: the role in prey attraction, **Psyche.**, v. 94, p. 151-158, 1987.

TIETJEN, W. J. & ROVNER, J. S. Chemical communication in lycosids and other spiders, in *Spider Communication. Mechanisms and Ecological Significance.*, eds. P. N. Witt & J. S. Rovner, Princeton University Press, Princeton, p. 249-279, 1982.

TOFT, S. Mate guarding in two *Linyphia* species (Araneae: Linyphiidae), **Bull. Brit. Arach. Soc.**, v. 8, p. 33-37, 1989.

TRAJANO, E. Fauna cavernícola brasileira: composição e caracterização preliminar. **Revista Brasileira de Zoologia.**, 3: 533-561, 1987.

YEARGAN, K. V. Biology of bolas spiders, **Ann. Rev. Entomol.**, v. 39, p. 81-99, 1994.

UHL, G. Ultrastructure of the accessory glands in the female genitalia of *Pholcus phalangioides* (Fuesslin, 1775) (Phlocidae; Araneae). **Acta Zoologica (Stokholm)** v. 75, p. 13-25, 1994.

YOUNG, A. R.; PINCUS, S. J. Comparison of enzymatic activity from three species of necrotising arachnids in Australia: *Loxosceles rufescens*, *Badumna insignis* and *Lampona cylindrata*. **Toxicon.**, v. 39, p. 391-400, 2001.

VALENTE, M. M. Estudo anátomo-histológico do aparelho genital da fêmea de *Romphobetens sorocabae* Mello-Leitão, 1923 (Araneae - Aviculariidae). Botucatu, 1984. **Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas)** - Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 1984.

VEIGA, S. S.; da SILVEIRA, R. B.; DREYFUSS, J. L.; HAOACH J.; PEREIRA, A. M.; MANGILI, O. C.; GREMSKI, W. Identification of high molecular weight serineproteases in *Loxosceles intermedia* (brown spider) venom. **Toxicon.**, v. 38, p. 825-839, 2000a.

VEIGA, S. S.; ZANETTI, V. C.; FRANCO, C. R. C.; TRINDADE, E. S.; PORCIONATTO, M. A.; MANGILI, O. C.; GREMSKI, W.; DIETRICH, C. P.; NADER, H. B. *In vivo* and *In vitro* cytotoxicity of brown spider venom for blood vessel endothelial cells. **Thromb. Res.**, v. 102, p. 229-237, 2001a.

VEIGA, S. S.; ZANETTI, V. C.; BRAZ, A.; MANGILI, O. C.; GREMSKI, W. Extracellular matrix molecules as targets for brown spider venom toxins. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 34, p. 843-850, 2001b.

VEIGA, S. S. Isolation and identification of *Clostridium perfringens* in the venom and fangs of *Loxosceles intermedia* (brown spider): enhancement of the dermonecrotic lesion in loxoscelism. **Toxicon.**, v. 40, p. 409-418, 2002.

VILELA E DELLA L. **Feromônios de insetos, biologia, química e emprego no manejo de pragas.** 2ª Edição, Ed. Holos, 2001.

WALCKENAER, C. A. **Histoire naturelles des Insects. Aptères - Araneae.** Paris., v. 4, p. 365-564, 1847.

WATSON, P. J. Transmission of a Female Sex Pheromone Thwarted by Males in the Spider *Linyphia litigosa* (Linyphiidae), **Science.**, v. 233, p. 219-221, 1986.

WENDELL, R. P.; Brown *recluse* spiders: a review to help guide physicians in nonendemic areas. **South. Med. J.**, v. 96 (5), p. 486-490, 2003.

UETZ, G. W., STRATTON, G. E. Acoustic communication and reproduction isolation in spiders In: **Spider Communication: Mechanisms and Ecological Significance** (Ed. by P.N. Witt & J. S. Rovner), Princeton: Princeton University Press, p. 123, 1982.

WEST, T. F.; CAMPBELL, G. A.; **DDT- The Synthetic Insectide**, Champman & Hall; London, p. 1, 1946.

WITT, P. N. The web as a means of communication, **Biosci. Commun.**, v. 1, p. 7-23, 1975.

ZANETTI, V. C.; DA SILVEIRA, R. B.; DREYFUSS, J. L.; HAOACH, J.; MANGILI, O.C.; VEIGA, S. S.; GREMSKI, W. Morphological and biochemical evidence of blood vessel damage and fibrinogenolysis triggered by brown spider venom. **Blood Coag. Fibrinol.**, v. 13, p. 135-148, 2002.

ZIMMERMAN, P. W.; HITCHCOCK, A. E.; **Contrib. Boyce Thompson Inst.**, v. 12, p. 321, 1942.

ZHU, Z.; ESPENSON, J. H. **J. Org. Chem.**, v. 60, p. 1326, 1995.